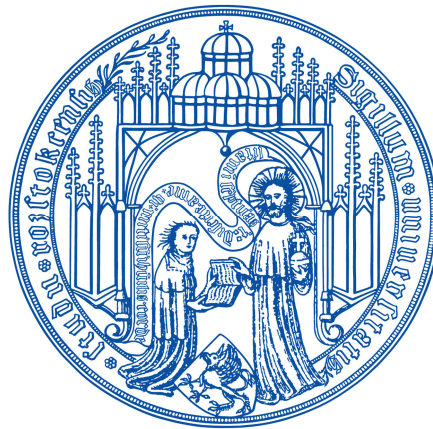


Universität Rostock

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Eigenschaften der Protein Z- und  
Protein Z abhängigen Protease Inhibitor-Defizienz  
während einer generalisierten Schwartzman Reaktion**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Philipp Nagel

geboren in Riesa

Rostock 2019

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

**Gutachter:**

1. Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar  
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie  
Universitätsmedizin Rostock
2. Univ.-Prof. Dr. med. Daniel A. Reuter  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie  
Universitätsmedizin Rostock
3. Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke  
Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
Universität des Saarlandes

**Jahr der Einreichung:** 2019

**Jahr der Verteidigung:** 2020

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	5
1. Einleitung .....	7
1.1. Sepsis .....	7
1.1.1. Definitionen .....	7
1.1.2. Epidemiologie .....	10
1.1.3. Ätiologie (Erreger) .....	11
1.1.4. Pathophysiologie .....	12
Inflammation .....	12
Koagulation .....	17
Mikrozirkulation .....	19
Organversagen .....	20
1.1.5. Klinik und Diagnose .....	21
1.1.6. Therapie .....	21
1.2. Protein Z und Protein Z abhängiger Protease-Inhibitor .....	23
1.2.1. Entdeckung .....	23
1.2.2. Biochemie .....	24
1.2.3. Interaktion .....	26
1.2.4. Physiologische Bedeutung .....	27
1.3. Ziele der Studie .....	29
2. Material und Methoden .....	31
2.1. Modell-Übersicht .....	31
2.2. Experimentelle Modelle .....	31
Versuchstiere .....	31
Versuchsgruppen .....	32
Generalisierte Schwartzman Reaktion .....	32
Anästhesie und Vorbereitung der Modell-Präparation .....	33
2.2.1. Modell der dorsalen Rückenhautkammer .....	33
Definition und Präparation .....	33
Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	37
Blutabnahme .....	38
Organasservierung und Versuchsende .....	39
2.2.2. <i>Air-Pouch</i> Modell .....	39
Definition und Präparation .....	39



TNF- $\alpha$ Injektion und Zell-Aspiration.....	40
Blutabnahme und Versuchsende.....	41
2.3. Datenerhebung.....	41
Blut- und Serumanalyse.....	41
Analyse der Mikrozirkulation .....	41
Histologische Analysen .....	45
Neubauer Zählkammer .....	45
2.4. Statistik .....	45
3. Ergebnisse .....	47
3.1. Eigenschaften der generalisierten Schwartzman Reaktion.....	47
3.2. Eigenschaften der Protein Z-Defizienz (PZko) während einer GSR.....	51
3.3. Eigenschaften der Protein Z abhängigen Protease Inhibitor-Defizienz (ZPIko) während einer GSR.....	58
3.4. Zusammenfassung .....	65
4. Diskussion .....	66
4.1. Diskussion von Material und Methoden.....	66
4.1.1. Modelle der Sepsis .....	66
4.1.2. Generalisierte Schwartzman Reaktion .....	67
4.1.3. Intravitalmikroskopie und Rückenhautkammermodell.....	68
4.1.4. <i>Air-Pouch</i> Modell.....	69
4.1.5. Interleukin 10 .....	70
4.1.6. <i>Knock-out</i> Modell .....	71
4.2. Diskussion der Ergebnisse .....	71
4.2.1. GSR als Sepsis-Modell der Maus .....	71
4.2.2. Wirkung der PZ-Defizienz während einer GSR.....	75
4.2.3. Wirkung der ZPI-Defizienz während einer GSR.....	78
4.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	80
5. Literaturverzeichnis.....	82
6. Glossar.....	97
7. CURRICULUM VITAE.....	101
8. Danksagung .....	103
Thesen zur Dissertation.....	104
Eidesstattliche Erklärung.....	105

# Zusammenfassung

## Hintergrund:

Die Sepsis stellt bis heute ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit einhergehender, hoher Letalität dar. Die Grundlagen der Pathophysiologie liegen in einer inadäquaten Reaktion des Organismus auf eine Infektion mit einhergehender Aktivierung der Inflammations- sowie Koagulations-Kaskade, Störung der Mikrozirkulation und konsekutiver Organdysfunktion. Einzelne Bestandteile dieser pathophysiologischen Prozesse haben einen modulierenden Einfluss auf den septischen Krankheitsverlauf und können somit potenzielle Agenzien in der Sepsis-Therapie darstellen. Von besonderer Bedeutung sind Agenzien mit Beeinflussung der Inflammation als auch der Koagulation. Ähnlich dem Wirkspektrum des aktivierten Protein C (aPC) könnten weitere Bestandteile der physiologischen Gerinnung inflammatorische Eigenschaften besitzen, wie das Protein Z (PZ) und der Protein Z abhängige Protease Inhibitor (ZPI).

Das PZ ist ein Vitamin-K abhängiges, 62kDa schweres Glykoprotein und wirkt als Cofaktor eines 72kDa schweren Serpins, dem ZPI. Die Funktion des ZPI besteht in der Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Xa, XIa sowie IXa. Durch die Interaktion des ZPI mit dem Cofaktor PZ, Calcium-Ionen sowie Phospholipiden wird die Faktor-Xa-Inaktivierung um das 1000-Fache verstärkt.

Entgegen der genauen Kenntnisse dieser anti-koagulatorischen Wirkmechanismen des PZ und des ZPI ist deren physiologische Bedeutung hinsichtlich der Koagulation umstritten. Darüber hinaus ist ein mögliches inflammatorisches Potenzial beider Komponenten bisher ungeklärt.

## Zielstellung:

Die vorliegende Arbeit untersucht die Eigenschaften einer PZ- und ZPI-Defizienz anhand eines murinen *knock-out* Modells (Wildtyp, WT; PZ *knock-out*, PZko; ZPI *knock-out*, ZPIko) sowie nach Induktion einer generalisierten Schwartzman Reaktion (GSR) als Modell einer Sepsis.

## Material und Methoden:

Nach Induktion einer GSR wurde zur repetitiven Evaluation der Mikrohämodynamik sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion die intravitale Fluoreszenzmikroskopie an einem dorsalen Rückenhautkammermodell der Maus angewandt (n=23 mit WT=9, PZko=8, ZPIko=6). Ergänzend erfolgte die quantitative Analyse der Leukozyten-Extravasation in einen *Air-Pouch* nach 4 Stunden (n=20 mit WT=8, PZko=6, ZPIko=6) sowie in das Lungen- und Leber-Gewebe nach 8,5 Stunden GSR. Darüber hinaus wurde in den Leberschnitten die Anzahl der Gefäßthromben erhoben. Additiv erfolgte innerhalb der Gruppen die laborchemische

Erfassung der Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozyten-Anzahl sowie die Bestimmung der Interleukin-10 (IL-10) Plasmakonzentration.

### **Ergebnisse:**

Nach Induktion einer GSR stellte sich in der WT-Gruppe eine signifikante Abnahme der mikrohämodynamischen Parameter sowie ein deutlicher Anstieg der leukozytären Adhärenz dar. Darüber hinaus konnte in den laborchemischen Analysen eine signifikante Leukozyto-, Thrombozyto- (jeweils um ca. 60%) und Erythrozytopenie (um ca. 10%) sowie ein Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration (um das 12-Fache) nach 8 Stunden GSR gemessen werden. Ebenfalls konnte nach 8,5 Stunden GSR eine deutlich erhöhte Extravasation von Leukozyten in das Leber- (um das 3,7-Fache) und Lungengewebe (um das 12-Fache) erhoben werden. Im Vergleich zu den WT-Tieren konnten in den PZ- und ZPI-defizienten Mäusen während der GSR keine Unterschiede hinsichtlich des mikrohämodynamischen Verlaufes erfasst werden. In den PZ-defizienten Tieren stellte sich eine signifikant erhöhte, leukozytäre Extravasation in den *Air-Pouch* nach 4 Stunden (um das 2-Fache) sowie in das Lungen- und Lebergewebe (jeweils um das 1,4-Fache) nach 8,5 Stunden GSR dar. Eine verminderte leukozytäre Adhärenz wurde sowohl in den Arteriolen (um ca. 79%) als auch in den Venolen (um ca. 34%) der PZko-Mäuse über den gesamten Verlauf der GSR beobachtet. Ergänzend trat eine frühzeitige Leukozytopenie in den PZ-defizienten Tieren nach 4 Stunden GSR (auf ca. 56% vs. WT) sowie eine um das doppelte erhöhte IL-10 Plasmakonzentration am Ende der GSR auf. In den ZPI-defizienten Tieren gab es kaum Unterschiede in den genannten Parametern im Vergleich zu den WT-Tieren. Auffällig war eine um ca. 8% signifikant erhöhte Rate an Gefäßthromben in den Leberschnitten nach 8,5 Stunden GSR.

### **Schlussfolgerungen:**

Eine GSR geht einher mit einer ausgeprägten Aktivierung der Inflammation, Koagulation sowie konsekutiven Verschlechterung der Mikrohämodynamik. Die GSR beinhaltet somit wichtige Elemente der septischen Pathophysiologie und stellt ein einfaches und reproduzierbares Sepsis-Modell der Maus dar. Eine PZ-Defizienz bewirkt nach Induktion der GSR eine aggravierte Immunreaktion, gekennzeichnet durch eine akzelerierte, transendotheliale Leukozyten-Migration, konsekutiv ausgeprägter Leukozytopenie sowie durch ein akzentuiertes Interleukin-10 Zytokinprofil. In den ZPI-defizienten Tieren stellte sich hingegen eine aggravierte, septische Koagulopathie dar mit akzelerierter Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

Im Umkehrschluss scheint das PZ eine anti-inflammatorische bzw. das ZPI eine anti-koagulatorische Potenz zu besitzen. Beide Substanzen stellen somit potenzielle Modulatoren eines septischen Krankheitsverlaufes dar. Um eine mögliche therapeutische Konsequenz dieser Agenzien abzuleiten, sind jedoch weitere Studien notwendig.

# 1. Einleitung

## 1.1. Sepsis

### 1.1.1. Definitionen

Um 400 v. Chr. definierte Hippokrates mit dem Satz „Das Fieber, das verursacht wird durch eine Materie, die fault“ das Krankheitsbild der Wundfäulnis und führte das „Wort“ Sepsis ein {Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., Vollmar 2011}. Im 19. Jahrhundert wurden, durch die Arbeiten des Chemikers Louis Pasteur (1822-1895), Bakterien und Mikroorganismen als Ursache für die Fäulnis angesehen und später, im Jahre 1914, Infektionen als ein wichtiger Bestandteil der Sepsis durch Hugo Schottmüller beschrieben {Vollmar 2011}. 1989 beschrieb Roger C. Bone das Sepsis-Syndrom als eine systemische Antwort auf eine Infektion, charakterisiert durch eine Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe sowie inadäquate Organperfusion oder Organdysfunktion {Bone et al. 1989}. Im August 1991 veranstalteten die Mitglieder des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* eine Konsensuskonferenz, in welcher die Definitionen für das *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischen Schock festgelegt wurden {ACCP/SCCM Conference 1992}. Diese zum späteren Zeitpunkt als „Sepsis-1“ bezeichnete Definition wurde im Jahr 2001 in einer erneuten Konferenz überarbeitet. Die grundlegende Definition wurde belassen und um weitere Symptome und Laborparameter erweitert („Sepsis-2“) (siehe Tabelle 1).

<b>SIRS</b>	<b>= 2 oder mehr</b> der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatur: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math> oder</li> <li>○ <math>\leq 36^{\circ}\text{C}</math></li> </ul> </li> <li>• Herzfrequenz: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\geq 90/\text{min}</math></li> </ul> </li> <li>• Atemfrequenz: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\geq 20/\text{min}</math> oder</li> <li>○ <math>\text{p}_a\text{CO}_2 \leq 33\text{mmHg}</math> bzw. <math>\leq 4,3\text{ kPa}</math></li> </ul> </li> <li>• Leukozyten: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>\geq 12000\text{ Zellen}/\text{mm}^3</math> oder</li> <li>○ <math>\leq 4000\text{ Zellen}/\text{mm}^3</math> oder</li> <li>○ <math>\geq 10\%</math> unreife Neutrophile im Differenzialblutbild</li> </ul> </li> </ul>
<b>Sepsis</b>	<b>= SIRS mit</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnose einer Infektion durch einen mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien</li> </ul>
<b>schwere Sepsis</b>	<b>= Sepsis mit</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dysfunktion eines Organs oder Organsystems (mind. 1 Kriterium) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ akute Enzephalopathie</li> <li>○ relative oder absolute Thrombozytopenie</li> <li>○ arterielle Hypoxämie</li> <li>○ renale Dysfunktionen</li> <li>○ metabolische Azidose</li> </ul> </li> </ul>
<b>septischer Schock</b>	<b>= Sepsis mit</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\geq 1\text{h}</math> Hypotension, trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution <ul style="list-style-type: none"> <li>○ systolischer Blutdruck <math>\leq 90\text{mmHg}</math> oder</li> <li>○ mittlerer arterieller Blutdruck <math>\leq 65\text{mmHg}</math></li> </ul> </li> <li>• oder notwendiger Einsatz von Vasopressoren</li> </ul>

**Tabelle 1:** Definition des *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), der Sepsis, der schweren Sepsis und des septischen Schocks. Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $\text{p}_a\text{CO}_2$ ). {Hagel et al. 2011, Remick 2007, Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., ACCP/SCCM Conference 1992}

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse hinsichtlich Pathophysiologie und Epidemiologie der Sepsis stellten zunehmend die Grenzen dieser Sepsis-Definition dar. Zudem offenbarten sich die Kriterien als unspezifisch und führten zu einer zunehmenden Diskrepanz erhobener Inzidenz- und Mortalitätsraten {Bracht et al. 2019, Weis et al. 2017, Singer et al. 2016}. Daraufhin wurde eine erneute Konsensuskonferenz im Jahr 2014 initiiert, dessen Resultate im Jahr 2017 als „Sepsis-3“ Definition veröffentlicht wurden. Hiernach wird Sepsis als eine „lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion“ definiert. Ein septischer Schock wird als diejenige Form der Sepsis beschrieben, welche mit einer schwerwiegenden, zirkulatorischen sowie zellulär-metabolischen Veränderung einhergeht und zu einem maßgeblichen Anstieg der Mortalität führt (siehe Tabelle 2 und 3) {Weis et al. 2017, Singer et al. 2016}. Der Begriff „schwere Sepsis“ wird in der aktuellen „Sepsis-3“ Definition nicht mehr aufgeführt.

<b>Sepsis</b>	<p><b>= lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organdysfunktion = akute Änderung des <b>SOFA-Score</b> um mindestens 2 Punkte im Rahmen der Infektion, dies entspricht einer Mortalitätsrate von &gt;10%</li> <li>• <b>qSOFA</b> = „Score zur Risikoabschätzung außerhalb des intensivstationären Settings: <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Mentaler Status: ≤14 (1 Punkt)</li> <li>◦ Atemfrequenz: ≥22 (1 Punkt)</li> <li>◦ Systolischer Blutdruck: ≤100mmHg (1 Punkt)</li> </ul> </li> <li>• <b>qSOFA-Score ≥2</b>: Einleitung erweiterter diagnostischer Maßnahmen zum Nachweis einer möglichen Organdysfunktion notwendig</li> </ul>
<b>Septischer Schock</b>	<p><b>= Form der Sepsis; gekennzeichnet durch eine schwerwiegende zirkulatorische und zellulär-metabolische Veränderung, welche zu einem maßgeblichen Anstieg der Mortalität führt</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• klinische Diagnose-Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ Sepsis</li> <li>◦ Einsatz von Vasopressoren zur Aufrechterhaltung eines MADs ≥65mmHg</li> <li>◦ Laktat &gt;2mmol/l (18mg/dl) trotz adäquater Volumensubstitution</li> </ul> </li> </ul>

**Tabelle 2:** Neue Definition der Sepsis und des septischen Schocks („Sepsis-3“ Definition). *Sepsis-related Organ Failure Assessment Score* (SOFA), *quick Sepsis-related Organ Failure Assessment Score* (qSOFA), mittlerer arterieller Druck (MAD). {Singer et al. 2016}

SOFA-Score	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b> paO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> mmHg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (49)	<200 (26,7) Beatmung	<100 (13,3) Beatmung
<b>Koagulation</b> Thrombozytenanzahl x10 <sup>3</sup> /μl	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Leber</b> Bilirubin mg/dl (μmol/l)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
<b>Kardiovaskulär</b> *5μg/kg/min für 1 Stunde	MAD ≥70mmHg	MAD <70mmHg	Dopamin <5* oder Dobutamin	Dopamin 5,1-15* oder Epinephrin ≤0,1* oder Norepinephrine ≤0,1*	Dopamin >15* oder Epinephrin >0,1* oder Norepinephrin >0,1*
<b>Glasgow Coma Scale Score</b>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b> Kreatinin mg/dl (μmol/l)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440) oder Diurese <500ml/d	>5,0 (440) oder Diurese <200ml/d

**Tabelle 3:** Tabellarische Übersicht zur Erhebung des SOFA-Scores. *Sepsis-related Organ Failure Assessment Score* (SOFA), arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO<sub>2</sub>), inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO<sub>2</sub>), mittlerer arterieller Druck (MAD). Modifiziert nach {Singer et al. 2016} und {Vincent et al. 1996}.

### 1.1.2. Epidemiologie

Die Sepsis stellt ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit einhergehender hoher Mortalität in Deutschland und weltweit dar {Bracht et al. 2019, Singer et al. 2016, Vincent et al. 2014, Brunkhorst 2006, Schmid et al. 2002}. Aufgrund der Anwendung verschiedener Sepsis-Definitionen und Studiendesigns ist ein Vergleich und die Erhebung internationaler, epidemiologischer Zahlen deutlich erschwert und uneinheitlich {Bracht et al. 2019, Fleischmann et al. 2016}. In Deutschland ergab eine Untersuchung der fallpauschalen-bezogenen Krankenhausstatistik für das Jahr 2013 eine adjustierte Rate von 335 an einer Sepsis erkrankten Menschen pro 100.000 Einwohner mit einer Krankenhaussterblichkeit von 24,3% {Fleischmann et al. 2016}. Die Mortalität für die schwere Sepsis und den septischen Schock wurde für das Jahr 2013 mit 43,6% bzw. 58,8% angegeben {Fleischmann et al. 2016}. Besonders

häufig tritt die Sepsis bei Neugeborenen und Patienten im höheren Alter auf, wobei die Letalität ab dem 40. Lebensjahr nahezu linear ansteigt {Fleischmann et al. 2016}. Darüber hinaus war ein Anstieg der Erkrankungsrate von 2007 bis 2013 um jährlich 5,7% auffällig {Bracht et al. 2019, Fleischmann et al. 2016}. Als Ursache wird der demographische Wandel mit der Zunahme multimorbider Patienten, der progrediente Einsatz medikamentöser, invasiver und immunsuppressiver medizinischer Maßnahmen sowie eine vermehrte Kodierung der Erkrankung in den Krankenhäusern angenommen {Fleischmann et al. 2016}. Ähnliche Tendenzen der Inzidenzraten konnten auch in anderen Ländern wie den USA {Hall et al. 2011}, Spanien {Bouza et al. 2014} oder Großbritannien {Harrison et al. 2006} beobachtet werden. Auch die ökonomischen Aspekte einer Sepsis-Therapie sind von großer Bedeutung. In Deutschland wurden für das Jahr 2013 Gesamtkosten von ca. 7,7 Milliarden Euro für die stationäre und nachfolgende ambulante Behandlung einer Sepsis erhoben {Fleischmann et al. 2016}. Pro Sepsis-Fall ergaben sich mittlere Leistungsausgaben von ca. 27.467,92 Euro {Fleischmann et al. 2016}. Schätzungsweise 30% des intensivmedizinischen Budgets werden für die Behandlung der schweren Sepsis in Deutschland ausgegeben {Werdan et al. 2016}. Internationale Analysen ergaben Gesamtkosten von ca. 32.421 US-Dollar pro Sepsis-Patient {Arefian et al. 2017}. In den USA stellte die Sepsis im Jahr 2011 das kostenintensivste Krankheitsbild mit ca. 20,3 Milliarden US-Dollar dar {Torio et al. 2013}.

### 1.1.3. Ätiologie (Erreger)

Zu den wichtigsten infektiösen Ursachen einer Sepsis zählen Bakterien und Pilze {Bracht et al. 2019, Rello et al. 2017}. Aber auch Infektionen mit Viren können der Auslöser sein {Rello et al. 2017, Vollmar 2011}. Innerhalb der bakteriellen Infektionen sind gramnegative und grampositive Bakterien annähernd gleich häufig vertreten {Bracht et al. 2019, Brunkhorst et al. 2005, Martin et al. 2003, Bochud et al. 2001, Bates et al. 1997}. Zu den häufigsten gramnegativen Erregern zählen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sowie *Klebsiella* {Bracht et al. 2019, Vincent et al. 2009}. Bei den grampositiven Bakterien stehen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus pneumoniae* in dem Vordergrund {Bracht et al. 2019, Vincent et al. 2009}. Dennoch findet sich eine Bakteriämie nur bei rund 30% der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock, in Abhängigkeit von einer antibiotischen Vorbehandlung {Marx et al. 2018, Fleischmann et al. 2016, Hagel et al. 2011, Bochud et al. 2001, Bates et al. 1997}. Bei Pilzinfektionen zählt die *Candida species* zu dem häufigsten Auslöser einer Sepsis {Vincent et al. 2009, Bochud et al. 2001}. In Übereinstimmung mit Studien aus den USA und Europa stellen Infektionen der Atemwege, des Abdomens sowie des Urogenitaltraktes die häufigsten Infektionsquellen dar {Bracht et al.



2019, Marx et al. 2018, Bloos et al. 2017, Brunkhorst 2006, Brunkhorst et al. 2005, Alberti et al. 2002, Bochud et al. 2001}.

Neben den Infektionen können auch primär nicht-infektiöse Ursachen, wie beispielsweise Unfall-, Operationstraumata sowie Verbrennungen, Ausgangspunkt in der Sepsis-Entstehung sein {Vollmar 2011}.

#### 1.1.4. Pathophysiologie

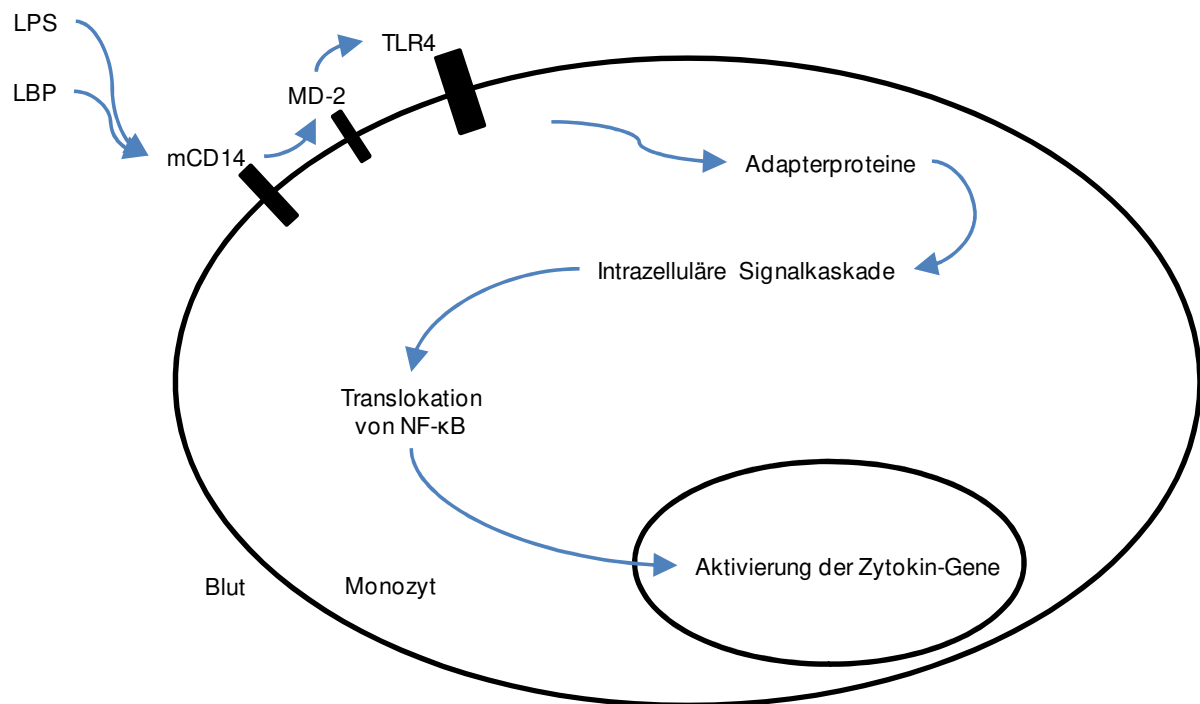
##### Inflammation

Die Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion. Die Grundlage der septischen Pathophysiologie stellt somit die Initiierung einer systemischen inflammatorischen Reaktion des Organismus auf eine Infektion dar. Die eindringenden Pathogene werden dabei aufgrund charakteristischer Muster und Struktur motive, den *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), durch das Immunsystem detektiert {Gyawali et al. 2019, Ertmer et al. 2016, Bochud et al. 2003}. Auch durch z.B. Operationen oder Unfälle freigesetzte endogene Proteine (Alarmine) werden durch das Immunsystem erkannt und in Analogie zu den PAMPs als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet {Gyawali et al. 2019, Ertmer et al. 2016, Vollmar 2011, Bianchi et al. 2007}. Die Detektion der PAMPs und DAMPs erfolgt durch ein Repertoire an Rezeptoren der Immunzellen, den *pattern-recognition receptors* (PRRs) {Ertmer et al. 2016, Vollmar 2011}. Die bekanntesten und wichtigsten PRRs sind die der *toll-like receptor* Familie (TLRs) {Ertmer et al. 2016, Vollmar 2011}. TLRs zählen zu den integralen Membran-Glykoproteinen und werden auf der Zell-Oberfläche sowie in intrazellulären Kompartimenten (Endosomen) verschiedener immunologischer (Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, bestimmte T-Zellen) und nicht-immunologischer Zellen (Fibroblasten, Epithelzellen) exprimiert {Akira et al. 2006}. Neben den TLRs gibt es noch weitere Erkennungssysteme wie die *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs), die *retinoid acid-inducible gene 1-like receptors* (RLRs) und die *C-type lectin receptors* (CLRs) {Gyawali et al. 2019, Wendel et al. 2009, Franchi et al. 2006, Robinson et al. 2006}. In Tabelle 4 sind einige PAMPs und DAMPs mit den dazugehörigen PRRs aufgelistet.

PAMPs		PRRs
Bakterien:	Lipopolysaccharide	TLR4
	Lipopeptide	TLR1/TLR2 sowie TLR6/TLR2
	Flagellin	TLR5
	CpG DNA	TLR9
Pilze:	Mannan	TLR4
	Phospholipomannan	TLR2
Parasiten:	Hemozoin	TLR9
	Glykoinositolphospholipide	TLR4
Viren:	DNA	TLR9
	dsRNA	TLR3
	ssRNA	TLR7 und TLR8
	Hüllen-Proteine	TLR4
DAMPs		PRRs
	Hitzeschockproteine (Hsp60, Hsp70)	TLR4
	Fibrinogen	TLR4
	Mitochondriale Strukturen	TLR9
	<i>high-mobility-group-protein B1</i> (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE

**Tabelle 4:** Beispiele für *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) mit den dazugehörigen *pattern-recognition receptors* (PRRs). *Toll-like receptor* (TLR), *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE). {Vollmar 2011, Akira et al. 2006}

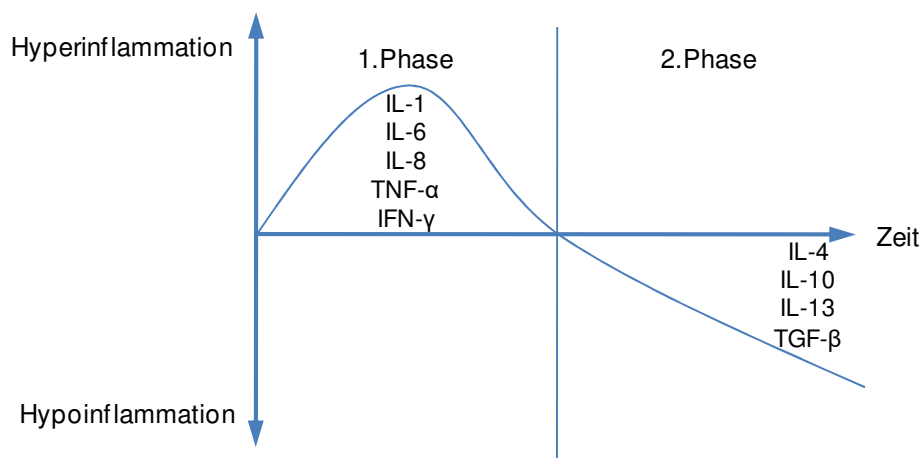
Am besten beschrieben ist die Interaktion zwischen Lipopolysacchariden (LPS) und dem TLR4 {Rosadini et al. 2017}. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und besteht aus einer als *Lipid A* bezeichneten Lipid-Portion, welche für die meisten krankheitsauslösenden Phänomene verantwortlich ist {Akira et al. 2006, Cohen 2002}. Der durch Abwehrreaktionen des angeborenen Immunsystems (z.B. Komplementsystem) hervorgerufene Zerfall gram-negativer Bakterien führt zur Freisetzung des Endotoxins LPS {Akira et al. 2006}. Im Blutkreislauf kann das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP), ein akute Phase Protein, an das LPS binden {Wright et al. 1990}. Der LPS-LBP-Komplex kann nun an die lösliche (sCD14) oder, vor allem durch Monozyten exprimierte, membran-gebundene (mCD14) Form des CD14-Moleküls binden {Wright et al. 1990}. Durch die Interaktion des Komplexes mit sCD14 können auch CD14-negative Zellen (z.B. Endothelzellen) auf LPS reagieren {Cohen 2002}. Der LPS-LBP-CD14-Komplex bindet nun mithilfe eines weiteren Moleküls, dem MD-2, an den TLR4 {Rosadini et al. 2017, Cohen 2002, Shimazu et al. 1999}. Über diverse Adapter-Proteine können unterschiedliche, intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden, welche u.a. zur Translokation des *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) in den Zellkern und der damit verbundenen Aktivierung von z.B. Zytokin-Genen führt (siehe Abb. 1) {Rosadini et al. 2017, Cohen 2002}.



**Abb. 1:** Vereinfachte und schematische Darstellung der Wirkung von LPS auf einen Monozyten. Lipopolysaccharid (LPS), Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP), membran-gebundene Form des CD14-Moleküls (mCD14), *Toll-like receptor* (TLR), *nuclear factor- κB* (NF-κB).

Durch die Detektion von PAMPs und DAMPs über die PRRs kommt es zur Aktivierung des angeborenen zellulären Immunsystems (v.a. der Monozyten) mit nachfolgender Stimulierung der Zytokinproduktion {Gyawali et al. 2019, Cohen 2002}. Die dabei sezernierten Zytokine Interleukin (IL) -1, IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) sowie Interferon-γ (IFN-γ) bilden die erste, proinflammatorische Phase im Verlauf einer Sepsis (siehe Abb. 2) {Vollmar 2011} und bewirken u.a. eine Erhöhung der Körpertemperatur, eine vermehrte Produktion von Akute-Phase Proteinen in der Leber sowie eine Induktion lokaler Entzündungsvorgänge {Oberholzer et al. 2001}. Neben der Aktivierung zellulärer werden auch nicht-zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems aktiviert. Eine der ersten Abwehrreaktionen stellt dabei das Komplementsystem über den alternativen Aktivierungsweg dar {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001}. Dieser beinhaltet die spontane Spaltung von C3 in C3a und C3b. Dabei bindet C3b an die Oberfläche der eingedrungenen Pathogene und aktiviert dadurch die Komplementkaskade {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001}. Weitere spätere Aktivierungswege des Komplementsystems erfolgen über das Mannose-bindende-Lektin (MBL-Aktivierungsweg), ein akute Phase Protein, sowie über die humorale Immunantwort (klassischer Aktivierungsweg) {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001}. Durch die Komplementaktivierung können Entzündungszellen durch die Anaphylatoxine C3a und C5a rekrutiert, Pathogene über C3b und C4b für Immunzellen opsoniert sowie durch die Bildung des *membran-attack complex* (C5b, C6, C7, C8, C9) direkt zerstört werden {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001, Bhakdi et al. 1991, Frank et al. 1991}. Eine besondere Bedeutung in der Auf-

rechterhaltung und Verstärkung der inflammatorischen Prozesse kommt hierbei den Anaphylatoxinen C5a und C3a zu. Über C5a und C3a Rezeptoren der Endothelzellen sowie diverser Immunzellen können weitere Entzündungszellen indirekt bzw. direkt aktiviert und rekrutiert werden {Foley et al. 2016}. Beispielsweise führt die Aktivierung der G-Protein gekoppelten C5a Rezeptoren der Endothelzellen zur Induktion inflammatorischer Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, *monocyte chemoattractant protein-1*), Erhöhung der endothelialen Permeabilität sowie Hochregulierung der P-Selektine {Foley et al. 2016}. Darüber hinaus bewirkt das Anaphylatoxin C5a eine vermehrte Expression von *tissue factor* (TF) durch Endothelzellen sowie Neutrophile und stellt somit eine Schlüsselstelle in der Initiierung der septischen Koagulopathie dar {Foley et al. 2016}.



**Abb. 2:** Idealisierter und typischer 2-Phasen-Verlauf des Zytokinprofils während einer Sepsis. Interleukin (IL), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). {Vollmar 2011}

Für die Bekämpfung eingedrungener Erreger ist auch die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Infektion von entscheidender Bedeutung. In den inaktiven Endothelzellen liegen die für die Diapedese wichtigen P-Selektine als Granula im Zytoplasma vor (Weibel-Palade-Körperchen) {Oberholzer et al. 2001}. Die durch u.a. C5a aktivierten Mastzellen sezernieren Leukotrien B4 und Histamin, welche neben dem C5a selbst in der Lage sind, die P-Selektine auf der Endothelzelloberfläche zu exprimieren {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001, Ribeiro et al. 1997, Foreman et al. 1994}. Im weiteren Verlauf der Sepsis erfolgt zusätzlich eine Hochregulierung von E-Selektinen auf den Endothelzellen durch die Wirkung von TNF- $\alpha$  und LPS {Oberholzer et al. 2001}. Darüber hinaus führt die Thrombin vermittelte Aktivierung der endothelialen *protease-activated receptors* (PAR-Rezeptoren) zur vermehrten Translokation der P- und E-Selektine sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in die Zellmembranen {Foley et al. 2016}.

Durch die Interaktionen von P- und E-Selektin der Endothelzellen mit dem *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) und L-Selektin der Monozyten und Neutrophilen können diese Immunzellen reversibel an der Gefäßwand haften und an dieser entlang rollen {Lim et al. 1998}. Die rollenden Leukozyten werden dadurch weiteren inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-8) ausgesetzt, wodurch eine Konformationsänderung der leukozytären Integrine (u.a. LFA-1, CR3) hervorgerufen wird {Oberholzer et al. 2001}. Über die Adhäsionsmoleküle des Endothels (ICAM-1, VCAM-1) können die Leukozyten nun fest an der Gefäßinnenwand haften {Petri et al. 2006}. Im Anschluss erfolgt die Durchwanderung der Endothelzellenschicht und darauffolgend die Migration der Leukozyten entlang eines Konzentrationsgradienten an Chemokinen zum Ort der Infektion {Oberholzer et al. 2001}.

Für die Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion einer Sepsis ist das *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1) von großer Bedeutung {Vollmar 2011}. Das HMGB1 stellt ein proinflammatorisches Zytokin aus der Alarmin Gruppe dar und wird von aktivierten Monozyten und Granulozyten sezerniert sowie aus nekrotischen Zellen freigesetzt {Stevens et al. 2017, Vollmar 2011, Wang et al. 2004}. Die Wirkung erfolgt u.a. über die PRRs TLR2, TLR4 und *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) mit der damit verbundenen Translokation von NF- $\kappa$ B und Genaktivierung proinflammatorischer Zytokine {Stevens et al. 2017, Park et al. 2004}.

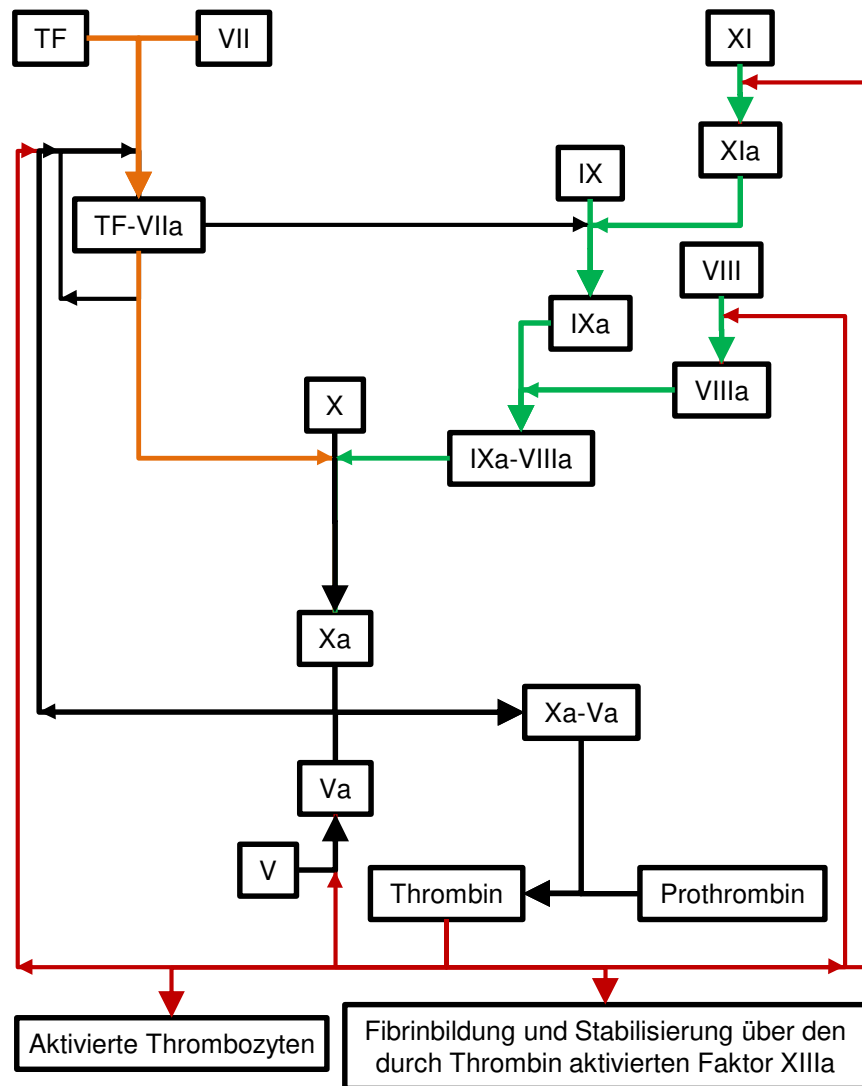
Neben dem angeborenen Immunsystem erfolgt im späteren Verlauf der Sepsis auch eine Aktivierung und Differenzierung des adaptiven Immunsystems. Sämtliche Mechanismen des angeborenen Systems dienen deshalb zur Überbrückung der Zeit und zur Verhinderung der Infektionsausbreitung bis ein effektives erworbenes Immunsystem aufgebaut ist {Oberholzer et al. 2001}. Nach Detektion, Phagozytose, Prozessierung und Antigen-Präsentation von Bestandteilen eindringender Erreger durch Antigen-Präsentierende Zellen (v.a. dendritische Zellen sowie Monozyten bzw. Makrophagen) erfolgt dessen Migration in lokale lymphatische Organe {Blum et al. 2018, Oberholzer et al. 2001}. Dort erfolgt die Präsentation gegenüber Antigen-spezifischen naiven T-Zellen sowie die T-Zell-Differenzierung in Abhängigkeit des vorliegenden Zytokinprofils und der damit einhergehenden Aktivierung einer zellulären bzw. humoralen Immunantwort {Schütt et al. 2009, Oberholzer et al. 2001}.

Durch eine vermehrte Produktion antiinflammatorischer Zytokine wechselt der Verlauf der Sepsis von einer initialen proinflammatorischen Antwort zu einem *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) {Rello et al. 2017, Vollmar 2011}. Diese 2. Phase ist, neben einem antiinflammatorischen Zytokinprofil, gekennzeichnet von einer Apoptose immunologischer Zellen wie beispielsweise der B-Zellen, der CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und der follikulären dendritischen Zellen {Tang et al. 2018, Hotchkiss et al. 2003}. Darüber hinaus tritt eine „Erschöpfung“ der Immunzellen auf mit einhergehender Anergie der T-Zellen, gekennzeichnet durch eine reduzierte Sekretion von Zy-

tokinen, sowie Anergie der Makrophagen bzw. Monozyten, hervorgerufen durch eine regrediente Expression der *major histocompatibility complex class II* (MHC II) Rezeptoren {Tang et al. 2018}. Sämtliche Prozesse führen zu einer Reduktion der antimikrobiellen Funktionen des Immunsystems mit resultierenden Aggravierung der Immunparalyse {Vollmar 2011}. Dadurch wird die Empfindlichkeit des Organismus gegenüber sekundären Infektionen erhöht und bereits vorhandene Organschäden protrahieren {Tang et al. 2018, Vollmar 2011, Oberholzer et al. 2001}, sodass in dieser Phase der septischen Erkrankung die meisten Todesfälle zu verzeichnen sind {Hotchkiss et al. 2003}.

## Koagulation

Die Gerinnungsaktivierung spielt neben der Aktivierung des Immunsystems auch eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis. Durch die Ausschüttung von Zytokinen während der proinflammatorischen Phase einer Sepsis werden Monozyten durch z.B. IL-6 {Levi 2007} sowie Endothelzellen durch z.B. TNF- $\alpha$ , Komplementfaktoren und Endotoxine aktiviert {Foley et al. 2016, Trappe et al. 2005}. In beiden Fällen führt die Aktivierung u.a. zu einer erhöhten TF-Expression auf diesen Zellen {Foley et al. 2016, Levi 2007, Trappe et al. 2005}. Durch die Bindung an den Faktor VII ist der TF in der Lage die extrinsische Gerinnungskaskade zu aktivieren und die Thrombin-Bildung zu initiieren {Esmon 2005}. Der aktivierte TF-Faktor-VIIa-Komplex und das gebildete Thrombin können weitere Bestandteile der intrinsischen Gerinnungskaskade aktivieren, wodurch die Koagulation verstärkt wird (siehe Abb. 3) {Esmon 2005}.



**Abb. 3:** Vereinfachte und schematische Darstellung der extrinsischen (-) und intrinsischen (-) Gerinnungskaskade sowie der Wirkung des gebildeten Thrombin (-). *Tissue factor* (TF). {Rassow et al. 2006, Esmon 2005}

Durch die Thrombin bedingte Spaltung membranständiger PAR-1 und PAR-4 Rezeptoren erfolgt die Aktivierung von Thrombozyten mit einhergehender Sekretion vasoaktiver (Plättchen-Aktivierender-Faktor, PAF), prokoagulatorischer (Faktor V, Von-Willebrand-Faktor) und Fibrinolyse hemmender (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, PAI-1) Substanzen {Foley et al. 2016, Trappe et al. 2005}. Des Weiteren wird auch das *cluster of differentiation 40 ligand* (CD40L) durch die aktivierten Plättchen exprimiert bzw. sezerniert als *soluble* CD40L (sCD40L), welches die Zytokin- und TF-Expression der Endothelzellen und Monozyten erhöht {Kapur et al. 2015, Trappe et al. 2005}. Die aktivierten Thrombozyten tragen somit zu einer weiteren Verstärkung der Gerinnungskaskade bei. Darüber hinaus bewirken die aktivierten Plättchen über die CD40L-CD40-Interaktion eine vermehrte Expression der P- und E-Selektine sowie der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM1 auf den Endothelzellen, sodass eine leukozytäre Extravasation begünstigt wird {Kapur et al. 2015}. Die andauernde Aktivie-

rung der Endothelzellen führt zu endothelialen Dysfunktionen mit Membrandefekten, Apoptose bis hin zur Zerstörung der Endothelzellschicht, wodurch bereits beeinträchtigte Organfunktionen weiter verschlechtert werden {Trappe et al. 2005}.

Parallel zu einer stetig aktivierten Gerinnung wird die natürliche Antikoagulation stark beeinträchtigt. So bewirkt der erhöhte Verbrauch, der gesteigerte proteolytische Abbau sowie die gleichzeitig verringerte Synthese von Antithrombin III, Protein C sowie *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) eine Wirkungsabschwächung dieser Antikoagulanzen {Levi et al. 2017, Ertmer et al. 2016, Levi 2007}. Darüber hinaus wird die antikoagulatorische Funktion des Protein C durch die progrediente Endothelzelldysfunktion mit Reduktion der Thrombomodulin- sowie *endothelial protein C receptor* (EPCR)-Expression negativ beeinflusst {Levi et al. 2017}. Durch eine TNF- $\alpha$  induzierte Hochregulierung der PAI-1 Expression (Leber, Endothelzellen) wird zudem die Fibrinolyse zunehmend supprimiert {Ertmer et al. 2016, Levi 2007}. Das gleichzeitige Auftreten einer aktivierten Gerinnung und beeinträchtigten natürlichen Antikoagulation kann in rund 30-35% der Fälle einer schweren Sepsis zur Ausbildung einer *disseminated intravascular coagulation* (DIC) führen {Levi et al. 2017, Bakhtiari et al. 2004}. Die DIC ist u.a. charakterisiert durch eine systemische intravasale Gerinnungsaktivierung mit mikrovaskulären Fibrinablagerungen und einer Erschöpfung von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren {Levi 2007}. Zu den möglichen Folgen einer DIC zählen das Multiorganversagen sowie schwere Blutungen {Levi 2007}.

## Mikrozirkulation

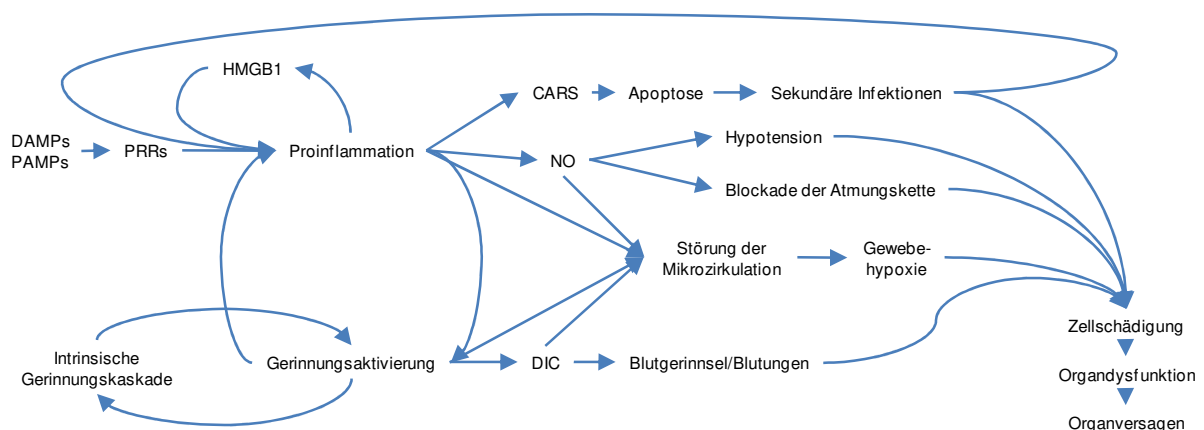
Sämtliche Veränderungen der Inflammation und der Gerinnung führen auch zu einer veränderten Mikrozirkulation. Durch eine verringerte Verformbarkeit der Erythrozyten und Leukozyten unter septischen Bedingungen, sowie durch „geschwollene“ Endothelzellen, Blutgerinnsel und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wird der Blutfluss in den mikrovaskulären Gefäßen behindert {Ertmer et al. 2016, Ellis et al. 2005, Spronk et al. 2004}. Dies führt zu einer Abnahme perfundierter Kapillaren mit dem Auftreten von *stopped-flow* Kapillaren und einer Zunahme der Blutfluss-Heterogenität {Ertmer et al. 2016, Ellis et al. 2005}. Die durch Entzündungsmediatoren induzierbare-NO-Synthase (iNOS) der Endothelzellen führt zur Freisetzung großer Mengen NO {Wendel et al. 2009}. Das NO stört die arterioläre Reaktion auf vasoaktive Stimuli {Ellis et al. 2005}. Hinzu kommen die durch andauernde Stimulierung hervorgerufenen Schädigungen der Endothelzellen, wodurch die vaskuläre endotheliale Kommunikation stark beeinträchtigt wird {Ellis et al. 2005}. Diese gestörte Reaktionsfähigkeit der mikrovaskulären Gefäße in Kombination mit der Zunahme der Blutfluss-Heterogenität resultiert in einer Sauerstoff-Fehlverteilung mit Gewebhypoxie und Aggravierung des Organversagens {Ellis et al. 2005}.



Die exzessive Bildung von NO durch die Endothelzellen bedingt auch eine direkte Inhibition des Komplexes IV der Atmungskette {Ertmer et al. 2016, Wendel et al. 2009}. Die dadurch bedingte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt über eine Reaktion mit NO zu der Bildung von Peroxynitrit {Wendel et al. 2009}. Das Peroxynitrit schädigt direkt Zellstrukturen und inhibiert weitere Bestandteile der Atmungskette {Ertmer et al. 2016, Wendel et al. 2009}.

## Organversagen

Viele Mechanismen der Inflammation und Gerinnungsaktivierung bis hin zur DIC beeinflussen wie o.g. die Mikrozirkulation negativ mit Bildung einer Gewebehypoxie in den Organen. Die durch NO hervorgerufene Blockade der Atmungskette in Kombination mit den durch Peroxynitrit hervorgerufenen Zellschädigungen führen zu einem weiteren Zelluntergang in dem bereits hypoxischen Gewebe. Verschlechtert wird der Zustand nochmals durch eine systemische Hypotension, bedingt durch die exzessive Bildung von NO, die Endothelzelldysfunktion mit einhergehender Vasoplegie, die forcierte Extravasation von Flüssigkeit, die progrediente Resistenz von adrenergen Gefäß-Rezeptoren sowie die direkte negative Beeinflussung der Myokard-Kontraktilität durch inflammatorische Mediatoren {Ertmer et al. 2016, Uhle et al. 2015}. Sämtliche Vorgänge resultieren in einer weiteren Reduktion der Organdurchblutung {Spronk et al. 2004}. Aus einer initialen Organdysfunktion entwickelt sich dadurch allmählich ein Organversagen und beim Auftreten in mehreren Organen ein Multiorganversagen (MOV) (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Vereinfachter und schematischer Überblick über die Pathogene der Sepsis. *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), *pattern-recognition receptors* (PRRs), *high-mobility-group-protein B1* (HMGB1), *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS), Stickstoffmonoxid (NO), *disseminated intravascular coagulation* (DIC).

Nicht aus jeder Infektion entwickelt sich eine Sepsis. Zu den beeinflussenden Faktoren zählen die Art, Menge und Virulenz der Erreger, Begleiterkrankungen, Ernährungsstatus, Alter sowie genetische Faktoren {Bauer et al. 2006, Hotchkiss et al. 2003}.

#### 1.1.5. Klinik und Diagnose

Die Diagnose einer Sepsis erfolgt anhand klinischer und paraklinischer Parameter. Entsprechend der noch gültigen, sich aktuell in Überarbeitung befindenden, deutschen Leitlinien wird hierfür die „Sepsis-2“ Definition zur Grundlage gelegt. Dementsprechend entspricht die Klinik der Sepsis den Kriterien einer SIRS und kann durch Veränderungen wie Hyper- oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose oder Leukopenie bzw. Linksverschiebung im Differentialblutbild in Erscheinung treten {Reinhart et al. 2010} (siehe Tabelle 1). Neuere, internationale Empfehlungen der *Surviving Sepsis Campaign* (SSC-Leitlinien) legen zur Diagnose bzw. Klinik die „Sepsis-3“ Definition zur Grundlage. Diese beinhaltet eine lebensbedrohliche Organdysfunktion im Rahmen einer Infektion, gekennzeichnet durch eine Änderung des SOFA-Scores um mindestens 2 Punkte (siehe Tabelle 2) {Rhodes et al. 2017}.

Bei klinischem Verdacht einer Sepsis sollte -zur weitergehenden Diagnostik- umgehend die Abnahme von Blutkulturen vor der erstmaligen Verabreichung einer kalkulierten Antibiotika-Therapie erfolgen {Martin et al. 2019}. Neben der allgemeinen Erhebung laborchemischer (Anzahl der Leukozyten) und klinischer (Körpertemperatur) Infektionsparameter können weitere klinische Marker zur Präzisierung der Diagnose eingesetzt werden wie z.B. das Procalcitonin (PCT), das C-reaktive Protein, das Interleukin-6 und das Lipopolysaccharid bindende Protein {Hagel et al. 2011}. Nach den deutschen Leitlinien wird eine frühzeitige Bestimmung des PCT zum Ausschluss einer schweren Sepsis bzw. zur Sicherung der Diagnose empfohlen {Reinhart et al. 2010}. Bei einer PCT-Konzentration von <0,5ng/ml im Serum ist eine schwere Sepsis oder ein septischer Schock unwahrscheinlich, bei Werten ab 2,0ng/ml hochwahrscheinlich {Reinhart et al. 2010}. Weiterhin kann die PCT-Verlaufsmessung erwogen werden, um die Dauer der antimikrobiellen Therapie zu verkürzen {Gyawali et al. 2019, Reinhart et al. 2010}.

Ergänzend muss nach Diagnosestellung einer Sepsis umgehend eine Fokussuche der Infektionsquelle eingeleitet werden, um weitere therapeutische Maßnahmen initiieren zu können.

#### 1.1.6. Therapie

Entscheidend für die Letalität einer Sepsis ist eine schnelle Diagnose sowie eine frühzeitige Einleitung der therapeutischen Maßnahmen {Hagel et al. 2011}.

Die **kausale Therapie** beinhaltet

- eine schnelle und wenn nötig auch operative Fokussanierung sowie

- eine frühestmögliche Antibiotika-Therapie innerhalb der ersten Stunde sowie nach Abnahme von zwei Blutkulturpärchen {Rhodes et al. 2017, Hagel et al. 2011}.

Mit jeder Stunde einer verspäteten Antibiotika-Gabe nimmt durchschnittlich die Anzahl der Überlebenden um 7,6% ab {Kumar et al. 2006}. Entsprechend den Empfehlungen der SSC-Leitlinien sollte eine Monotherapie mit einem empirischen Breitbandantibiotikum bei der Diagnose einer Sepsis bzw. eine Kombinationstherapie bei Patienten mit septischen Schock angewandt werden {Rhodes et al. 2017}. Das initiale Antibiotika-Regime sollte im Verlauf entsprechend der Resistogramm-Befunde deeskaliert werden. Insgesamt wird eine Therapiedauer für insgesamt 7-10 Tagen sowie ein Monitoring mittels PCT-Analyse empfohlen {Rhodes et al. 2017}. Eingesetzt werden können beispielsweise Ureidopenecilline (Piperacillin), Cephalosporine der 3. oder 4. Generation (Ceftazidim, Cefepim), Carbapeneme (Imipenem, Meropenem) sowie bei methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Linezolid bzw. Daptomycin und bei Sepsis infolge einer ambulant erworbenen Pneumonie eine Kombination aus einem  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum und einem Makrolid {Hagel et al. 2011}.

Zu den **supportiven Therapiemaßnahmen** zählen

- die Volumentherapie mit vorzugsweise kristalloiden Lösungen,
- der Einsatz von Vasopressoren und Inotropika (Dobutamin bei eingeschränktem Herz-Zeit-Volumen und Noradrenalin bei einem mittleren arteriellen Druck  $\leq 65$  mmHg trotz Volumentherapie) sowie situationsbedingt
- ein Nierenersatzverfahren und
- eine invasive Beatmung {Hagel et al. 2011}.

Zielwerte der Volumentherapie sind ein zentraler Venendruck (ZVD)  $\geq 8$  mmHg ( $\geq 12$  mmHg unter Beatmung), ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAD)  $\geq 65$  mmHg, eine Diurese  $\geq 0,5$  ml/kg/h, eine zentral venöse Sauerstoffsättigung  $\geq 70\%$  sowie ein Laktat  $\leq 1,5$  mmol/l {Hagel et al. 2011}. Als Richtwert der initialen Flüssigkeitsapplikation wird eine Menge von 30 ml/kg Körpergewicht in den ersten 3 Stunden bei dem Auftreten einer Hypotension oder einem Serum-Laktat von  $> 4$  mmol/l empfohlen {Martin et al. 2019, Rhodes et al. 2017}. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit einer Laktat-gesteuerten Volumentherapie in der kalkulierten Flüssigkeitsapplikation berücksichtigt werden {Martin et al. 2019, Rhodes et al. 2017}.

Eine Beatmung sollte frühzeitig erfolgen bei einer Atemfrequenz  $> 35$  /min, einer muskulären Erschöpfung, einer eingeschränkten Vigilanz sowie einer Sauerstoffsättigung  $\leq 90\%$  trotz Sauerstoff-Gabe {Hagel et al. 2011}.

Entsprechend des klinischen Nachweises eines verbesserten Outcomes in der Sepsis-Therapie unter zeitgerechter Einhaltung eines „Bündels“ an Maßnahmen wurde das „*Hour-1 Surviving Sepsis Campaign Bundle of Care*“ konzipiert, welches die wichtigsten Erstmaß-

nahmen beinhaltet, die innerhalb einer Stunde nach Präsentation des Patienten eingeleitet werden sollten (siehe Tabelle 5) {Martin et al. 2019, Levy et al. 2018, Levy et al. 2014}.

<p>„Hour-1 Surviving Sepsis Campaign Bundle of Care“</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messung des Serum-Laktats. Erneute Messung, wenn initiales Serum-Laktat &gt;2mmol/l.</li> <li>• Abnahme der Blutkulturen vor Antibiotika-Gabe.</li> <li>• Gabe eines Breitbandantibiotikums.</li> <li>• Initiale Volumensubstitution (30ml/kg Körpergewicht) mit kristalloiden Lösungen bei Hypotonie oder Serum-Laktat ≥4mmol/l.</li> <li>• Vasopressoren-Einsatz bei anhaltender Hypotonie trotz Volumensubstitution zur Aufrechterhaltung eines MAD ≥65mmHg.</li> </ul>
--	---

**Tabelle 5:** Darstellung der „Hour-1 Surviving Sepsis Campaign Bundle of Care“-Maßnahmen in der empfohlenen Ersttherapie der Sepsis. Mittlerer arterieller Druck (MAD). Modifiziert nach {Levy et al. 2018}.

Die **adjuvante Therapie** besteht aus

- einer Gabe niedrigdosierter Glukokortikoide (200mg Hydrocortison pro Tag) als *Ultima Ratio* bei therapierefraktären septischen Schock sowie
- einer Korrektur des Blutzuckerspiegels bei Werten über >150mg/dl {Hagel et al. 2011}.

Aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse in klinischen Studien hinsichtlich einer positiven Beeinflussung der Mortalität septischer Patienten wird der Einsatz von rekombinanten aktivierten Protein C (rhAPC) kontrovers diskutiert {Kumar 2019, Ranieri et al. 2012, Hosac 2002, Bernard et al. 2001}. Während die Verabreichung von rhAPC bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischen Schock und hohem Sterberisiko in den deutschen Leitlinien noch aufgeführt wird {Hagel et al. 2011}, ist der Einsatz in den internationalen SSC Richtlinien nicht mehr empfohlen {Rhodes et al. 2017}. Darüber hinaus wird, sowohl in den deutschen als auch den internationalen Leitlinien, von einer intensivierten Insulintherapie sowie der Gabe von Antithrombin III abgeraten {Rhodes et al. 2017, Reinhart et al. 2010}. Hinsichtlich der Ernährung sollte wenn möglich eine orale bzw. enterale Verabreichung einer parenteralen Gabe bevorzugt werden {Rhodes et al. 2017, Hagel et al. 2011}.

## 1.2. Protein Z und Protein Z abhängiger Protease Inhibitor

### 1.2.1. Entdeckung

Im Jahr 1977 isolierten Prowse und Esnouf erstmals ein neues, Warfarin-sensitives Protein aus dem Rinderplasma und benannten es Protein Z (PZ), da es das letzte eluierte und Vitamin-K abhängige Protein in der Anionen-Austausch-Chromatographie darstellte {Broze 2001, Prowse et al. 1977}. Sieben Jahre später wurde das PZ auch im humanen Plasma durch Joseph P. Miletich und George J. Broze entdeckt {Broze et al. 1984}. Erst 1998, weitere 14

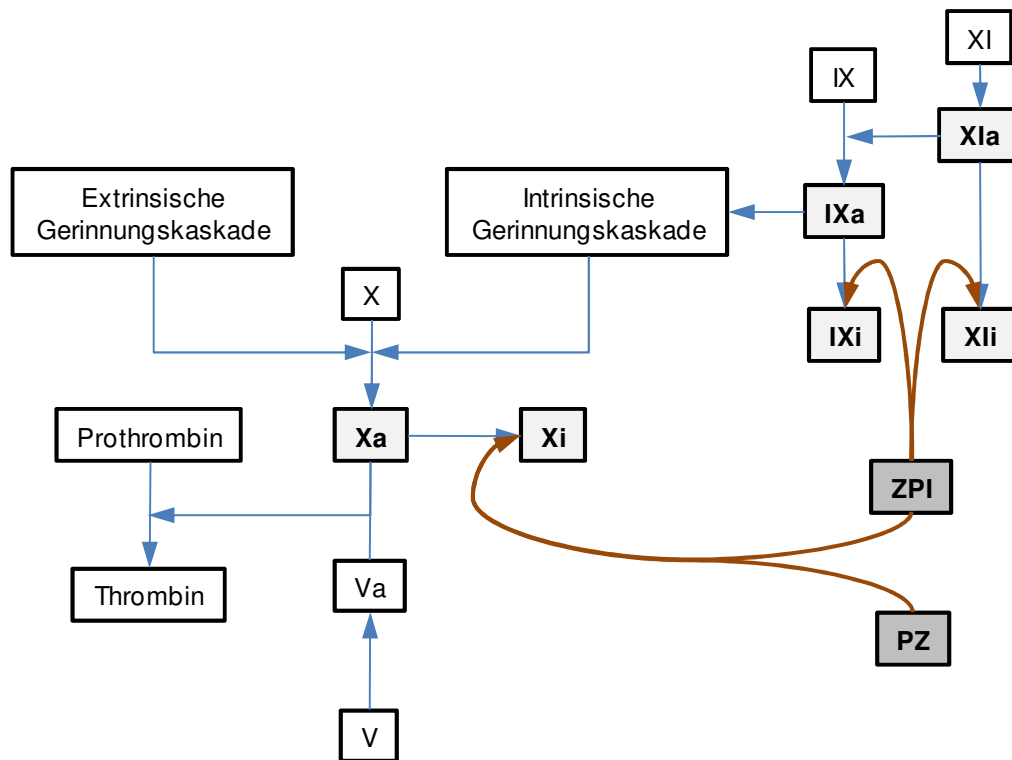
Jahre später, wurde der Protein Z-abhängige Protease Inhibitor (ZPI) erstmal durch Han et al. isoliert und benannt {Han et al. 1998}.

### 1.2.2. Biochemie

Das PZ ist ein 62 kDa schweres, Vitamin-K abhängiges Glykoprotein mit einer genetischen Organisation auf dem Chromosom 13q34 {Broze et al. 1984, Fujimaki et al. 1998, Vasse 2008}. Die molekulare Struktur ist ähnlich zu anderen Vitamin-K abhängigen Faktoren wie z.B. Faktor VII, IX, X und Protein C {Vasse 2011}. Sie besteht aus einer  $\gamma$ -Carboxyglutamat (GLA)-Domäne, einer  $\alpha$ -Helikalen-Region mit einem Cluster an aromatischen Resten, zwei *epidermal growth factor* (EGF)-like Modulen sowie einem Serin-Protease-like Modul {Vasse 2008, Ichinose et al. 1990}. Obwohl eine strukturelle Analogie zu anderen Serin-Proteasen besteht, besitzt das PZ selbst keine proteolytische Aktivität u.a. aufgrund einer veränderten Zusammensetzung der katalytischen Triade (Aspartat und Lysin anstelle von Serin und Histidin) {Vasse 2008, Ichinose et al. 1990}. Erst durch die Isolierung des ZPI konnte die Funktion des PZ als Cofaktor bestätigt werden {Han et al. 1998}. Hauptsyntheseort des PZ ist die Leber {Vasse 2008, Kemkes-Matthes et al. 1995}. Aber auch in den Endothelzellen, in einigen Zellen der Nieren und pathologisch auch in einigen Tumorzellen konnte eine Synthese von PZ nachgewiesen werden {Vasse 2011, Broze et al. 2010, Vasse et al. 2006}. Die biologische Halbwertszeit von PZ beträgt ca. 2,5 Tage und im EDTA antikoagulierte Blutplasma ergibt sich eine mittlere PZ-Konzentration von  $2,9 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  {Broze 2001, Broze et al. 1984}. Dabei auffallend ist die weite Verteilung der Einzelwerte mit  $0,6\text{-}5,7 \mu\text{g/ml}$ , sodass eine Beeinflussung der Plasma PZ-Konzentrationen durch verschiedene Faktoren naheliegend ist {Broze 2001}. Ein wichtiger Faktor ist die, durch die Gla-Domäne bedingte, sehr sensitive Regulation der PZ-Synthese in Abhängigkeit von der u.a. ernährungsbedingten Verfügbarkeit von Vitamin-K {Vasse 2011, Souri et al. 2009}. Auch hormonelle Faktoren scheinen zu den Schwankungen der PZ-Konzentration im Plasma der normalen Bevölkerung beizutragen. So ist die Einnahme von oralen Kontrazeptiva mit einem höheren PZ-Plasma-Level assoziiert und es konnten verminderte PZ-Konzentrationen in postmenopausalen vs. jüngeren Frauen gefunden werden {Vasse 2011, Heeb et al. 2007, Al-Shanqeeti et al. 2005}. In der Maus hingegen führt eine Gabe von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol zu einer Senkung der hepatischen mRNA von PZ und ZPI {Cleuren et al. 2010}. Im Blut zirkuliert das PZ in einem Komplex mit dem ZPI {Tabatabai et al. 2001}. Im Mausmodell führt dabei ein ZPI-Defizit zu einer Senkung des PZ-Spiegels um ca. 43%, sodass die Konzentration von ZPI im Blut einen beeinflussenden Faktor in der Regulierung des PZ-Plasma-Levels darstellt {Zhang et al. 2008}. Auch genetische Mutationen stellen einen beeinflussenden Faktor der Plasma-PZ-Konzentration dar. So

konnten für 2 von insgesamt 110 im PZ-Gen entdeckten *single nucleotide polymorphisms* (SNP) ein Einfluss auf den PZ-Blutspiegel nachgewiesen werden {Vasse 2011}.

Der Protein Z-abhängige Protease Inhibitor (ZPI) ist ein 72 kDa schweres Protein mit einer genetischen Lokalisation auf Chromosomen 14q32,1 {Corral et al. 2007, Han et al. 1999, Han et al. 1998}. Das ZPI ist ein Serpin, da seine Struktur zu 25-35% mit der von Protease-Inhibitoren der Serpin-Superfamilie übereinstimmt {Han et al. 1999}. In Gegenwart von PZ, Calcium-Ionen und prokoagulatorischen Phospholipiden kann das ZPI den Faktor Xa inhibieren (siehe Abb. 5) {Han et al. 2000}. Ohne das PZ wird die Hemmung des Faktor Xa durch das ZPI um das 1000-Fache reduziert {Han et al. 2000}. Im reaktiven Zentrum des ZPI befindet sich die Aminosäure Tyrosin, welche die spontane Interaktion von ZPI mit dem Faktor Xa stark beeinträchtigt, gleichzeitig aber eine Proteolyse durch diesen Faktor verhindert {Vasse 2011, Han et al. 1999}. Weiterhin kann das ZPI den Faktor XIa inaktivieren, auch ohne die Anwesenheit von PZ, Calcium-Ionen und Phospholipiden {Han et al. 2000}. Auch eine nicht durch die Serpin-Protease-Aktivität des ZPI erfolgende Hemmung des Faktor IXa konnte gezeigt werden {Corral et al. 2007, Heeb et al. 2005}. Heparin stellt einen weiteren ZPI-Aktivator dar. Durch diesen Mechanismus können sowohl der freie, nicht membrangebundene Faktor Xa als auch der Faktor XIa inaktiviert werden {Huang et al. 2011}. Das ZPI wird v.a. in der Leber synthetisiert und erreicht im normalen humanen Plasma eine Konzentration von ca. 3,84µg/ml {Han et al. 2000, Han et al. 1999}. Ähnlich wie die bereits o.g. Beeinflussung der PZ-Plasmakonzentration durch das ZPI wird auch die ZPI-Plasmakonzentration durch das PZ beeinflusst. So konnte unter einer chronischen Warfarin-Therapie nicht nur ein starker Abfall der PZ-, sondern auch eine Reduktion der ZPI-Konzentration um 45% gezeigt werden {Vasse 2011, Tabatabai et al. 2001}. Dementsprechend wird vermutet, dass die Sekretion oder Clearance von ZPI durch einen bislang unbekannten Mechanismus des PZ beeinflusst wird {Vasse 2011, Al-Shanqeeti et al. 2005, Tabatabai et al. 2001}. Ebenfalls vergleichbar zu PZ in der ZPI *knock-out* Maus, führt ein PZ-Defizit zu einer jedoch geringeren Senkung der ZPI-Konzentration um ca. 24% (vs. 43%, s.o.) {Zhang et al. 2008}. Weiterhin sind auch genetische Modifikationen im ZPI-Gen bekannt {Corral et al. 2006}. Die Auswirkung dieser genetischen Varianten auf die ZPI-Konzentration im Blut wurde jedoch noch nicht publiziert {Vasse 2011}. Dennoch konnte für einen *nonsense* Polymorphismus ein 3,3-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer venösen Thrombose gezeigt werden {Corral et al. 2006}. Auch für die Einnahme oraler Kontrazeptiva konnte eine erhöhte ZPI-Konzentration im Blut nachgewiesen werden, sodass hormonelle Faktoren wie beim PZ einen beeinflussenden Faktor für den Plasmaspiegel darstellen {Al-Shanqeeti et al. 2005}.

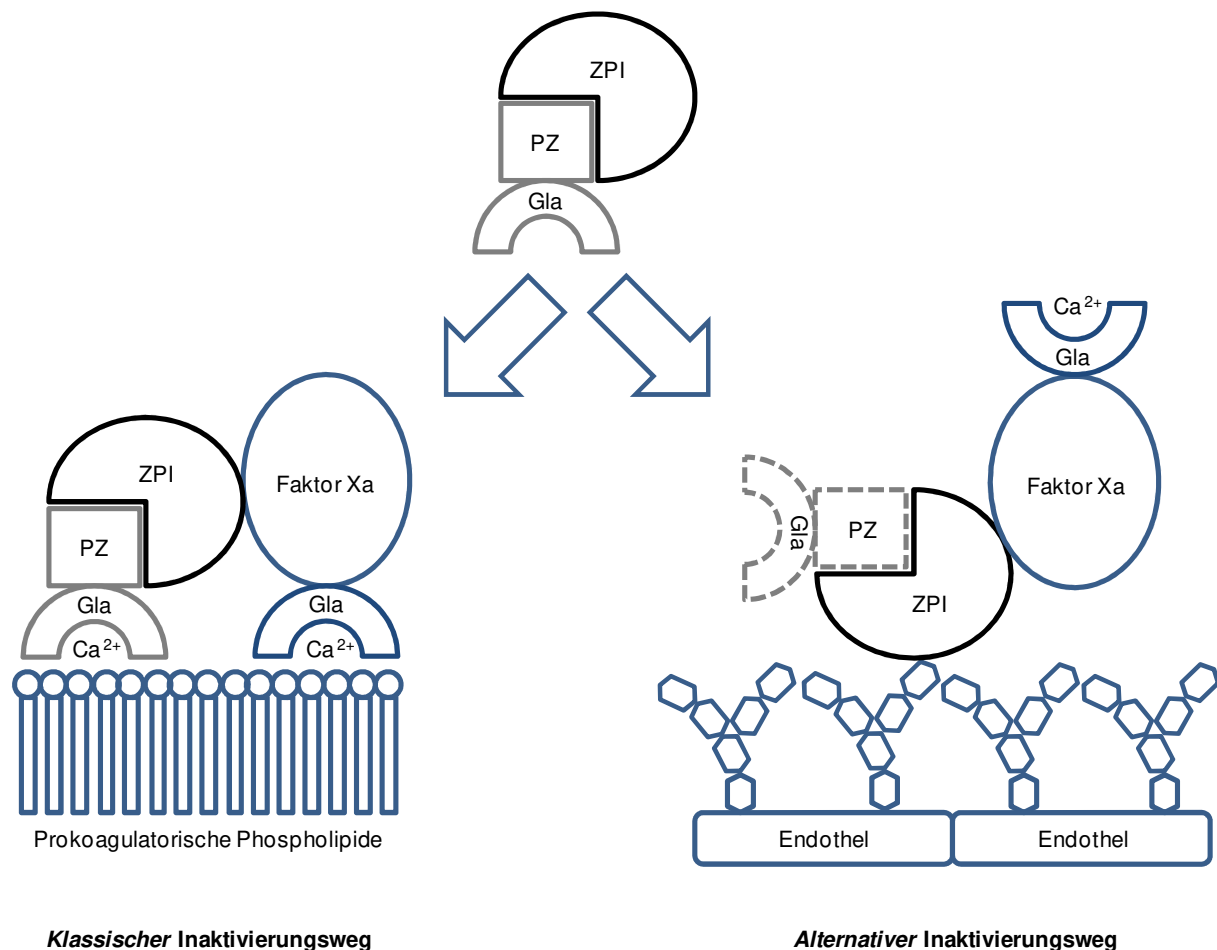


**Abb. 5:** Vereinfachte und schematische Darstellung der Interaktionen von Protein Z (PZ) und Protein Z-abhängigen Protease Inhibitor (ZPI) mit einzelnen Komponenten der Gerinnungskaskade.

### 1.2.3. Interaktion

Das Serpin ZPI kann, wie bereits oben geschildert, die Faktoren Xa, XIa und IXa inaktivieren {Heeb et al. 2005, Han et al. 2000}. In Anwesenheit und durch die Interaktion mit dem Co-Faktor PZ, Calcium-Ionen und Phospholipiden wird die Faktor-Xa-Inaktivierung durch das ZPI um das 1000-Fache verstärkt {Han et al. 2000}. Dieser Vorgang kann auch nach Komplexbildung zwischen Faktor Xa und Faktor Va erfolgen {Huang et al. 2019}. Im Blutplasma zirkuliert das PZ zusammen mit dem ZPI in einem PZ-ZPI-Komplex {Tabatabai et al. 2001}. Diese Komplexbildung erfolgt zwischen der C-terminalen PZ-Domäne und dem ZPI durch insgesamt 10 Aminosäure-Reste (6 von PZ, 4 von ZPI), welche 3 Salzbrücken-Cluster bilden und durch 9 zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden {Vasse 2011, Rezaie et al. 2008}. Weiterhin wird vermutet, dass durch diese Bindung des PZ eine strukturelle Veränderung des ZPI hervorgerufen wird, wodurch die Interaktion mit dem Faktor Xa optimiert wird {Rezaie et al. 2008}. Mithilfe der Calcium-Ionen kann nun der PZ-ZPI-Komplex über die Gla-Domäne von PZ an prokoagulatorische Phospholipide binden {Vasse 2011}. Auch der Faktor Xa bindet über seine Gla-Domäne an die Phospholipide. Im Anschluss bildet sich über die Interaktion der beiden Gla-Domänen von PZ und Faktor Xa ein PZ-ZPI-FXa-Komplex {Rezaie et al. 2008}. Erst durch diese Interaktionen ist eine Inaktivierung des Faktor Xa durch das ZPI möglich {Vasse 2011, Rezaie et al. 2008}. Neben diesem *klassischen* Weg der Inaktivierung wird auch ein *alternativer* Weg beschrieben (siehe Abb. 6).

Hierbei wird das ZPI durch Glykosaminoglykane auf der Oberfläche von Endothelzellen aktiviert und kann so den freien Faktor Xa inaktivieren, ganz ohne prokoagulatorische Phospholipide, jedoch nur unter Anwesenheit von Calcium-Ionen {Huang et al. 2011, Vasse 2011}. Ob für diesen Mechanismus auch PZ benötigt wird, ist nicht bekannt {Vasse 2011}. Nach der Inaktivierung des Faktors Xa wird das ZPI gespalten, wodurch seine hohe Affinität zu dem PZ verloren geht {Vasse 2011, Huang et al. 2008}.



**Abb. 6:** Vereinfachte und schematische Darstellung des klassischen und alternativen Inaktivierungsweg des Faktor Xa. Protein Z (PZ), Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI), γ-Carboxyglutamat-Domäne (Gla). {Vasse 2011}

#### 1.2.4. Physiologische Bedeutung

Die physiologische Relevanz von PZ und ZPI wird seit der Entdeckung bis heute z.T. kontrovers diskutiert.

Im Mausmodell ist ein alleiniger PZ *knock-out* (PZko) asymptotisch {Yin et al. 2000}. Auch die ZPI *knock-out* (ZPIko) Mäuse weisen ab der Geburt keine Unterschiede zu ihren heterozygoten und Wildtyp-Geschwistern auf, jedoch wurde während der Schwangerschaft ein vermehrter Verlust von ZPIko-Mäusen beobachtet {Zhang et al. 2008}. Beide *knock-outs* führen in Kombination mit dem Faktor V<sub>Leiden</sub> zu einer dramatischen Verstärkung des pro-



thrombotischen Phänotyps, wobei der des ZPIko stärker ausgeprägt ist als der des PZko {Zhang et al. 2008, Yin et al. 2000}. Sowohl der PZko als auch der ZPIko der Maus führen weiterhin zu einem Anstieg des Thromboserisikos nach arterieller Gefäßverletzung, sowie zu einer erhöhten Mortalität pulmonaler Thromboembolien {Zhang et al. 2008}. Auch innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte der prothrombotische Phänotyp des ZPIko nachgewiesen werden {Butschkau et al. 2013}. In klinischen Studien war eine geringe Plasma-PZ-Konzentration assoziiert mit dem Auftreten von Schlaganfällen, peripheren arteriellen Erkrankungen und tiefen Venenthrombosen {Sofi et al. 2009, Santacroce et al. 2006, Heeb et al. 2002, Vasse et al. 2001}. Eine 2010 erhobene Meta-Analyse von Sofi et al. konnte die Assoziation zwischen geringen PZ-Konzentrationen und einem erhöhten Thromboserisiko, arteriellen vaskulären Erkrankungen, Schwangerschaftskomplikationen und venösen thromboembolischen Erkrankungen bestätigen {Sofi et al. 2010}. Andere Studien konnten für den ischämischen Schlaganfall und die venöse Thrombose keinen, z.T. auch gegenteiligen Zusammenhang mit dem PZ-Plasmaspiegel feststellen {Al-Shanqeeti et al. 2005, Lichy et al. 2004, Kobelt et al. 2001, Vasse et al. 2001}. Hinsichtlich der Beziehung zwischen arteriellen/venösen thrombotischen Erkrankungen und der ZPI-Plasmakonzentration gibt es nur einige wenige Studien {Vasse 2011}. So konnten signifikant verminderte ZPI-Plasmaspiegel in Patienten mit peripheren arteriellen Erkrankungen, sowie ein *nonsense* Polymorphismus mit einem erhöhten venösen Thromboserisiko gefunden werden {Sofi et al. 2009, Corral et al. 2006}. Andere Studien hingegen konnten keinen Einfluss von ZPI auf das Auftreten von Schlaganfällen, koronaren Herzkrankheiten sowie venöse Thrombosen zeigen {Razzari et al. 2006, Refaai et al. 2006, Al-Shanqeeti et al. 2005}. In einem Hämophilie-A-Mausmodell stellte sich nach Inhibierung der PZ-ZPI-Komplexbildung durch die Hinzugabe eines PZ-Antikörpers eine verbesserte Gerinnungssituation dar {Girard et al. 2019}.

Hinsichtlich inflammatorischer Eigenschaften von PZ und ZPI gibt es nur sehr wenige zum Teil gegensätzliche Studien. In Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte eine Korrelation zwischen der PZ-Plasmakonzentration und dem Transferrin, einem negativen akuten Phase Protein, entdeckt werden {Vasse et al. 2002, Raczkowski et al. 1987}. Auch konnte in Patienten mit akuter Leukämie und Non-Hodgkin Lymphom ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen dem PZ- und IL-6-Plasmalevel festgestellt werden {Undar et al. 1999}. Vasse et al. behandelten kultivierte Hepatozyten mit Zytokinen und fanden verminderte PZ-Konzentrationen in den TNF- $\alpha$  und IL-4 ausgesetzten Hepatozyten {Vasse et al. 2002}. 2006 konnte innerhalb der Arbeitsgruppe sogar eine verminderte Produktion von PZ in Endothelzellen durch TNF- $\alpha$ , sowie eine erhöhte Synthese durch Oncostatin M, einem Zytokin der IL-6 Familie, nachgewiesen werden {Vasse et al. 2006}. Eine ZPI-Produktion der Endothelzellen konnte nicht nachgewiesen werden {Vasse et al. 2006}. Weiterhin konnte auch ein signifikanter PZ-Anstieg, 72h nach einer perkutanen koronaren Intervention, gezeigt werden {Ce-

sari et al. 2007}. In einem Maus-Modell konnte nach Auslösung einer akuten Phase-Reaktion ein Anstieg der ZPI-Konzentration nachgewiesen werden als möglicher Hinweis einer Bedeutung des ZPI als akute Phase-Reaktant {Girard et al. 2013}.

In einer weiteren Studie konnte ein Abfall der PZ-Konzentration in Abhängigkeit von der Progression maligner Tumoren entdeckt werden {Shang et al. 2005}. Auch konnte ein Zusammenhang von hohen PZ-Levels mit einer Hypertriglyceridämie, sowie eine Sekretion von PZ in den Urin gezeigt werden {Broze et al. 2010, Heeb et al. 2002}.

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der Koagulation feststellen, dass ZPI- und -in geringerer Ausprägung- auch PZ-Defizite, in Kombination mit weiteren gerinnungsaktivierenden Faktoren, zu einer Verstärkung des prokoagulatorischen Gerinnungszustandes beitragen. Die klinischen Auswirkungen der tierexperimentell gewonnenen Erkenntnisse auf arterielle und venöse Erkrankungen im Menschen konnten z.T. durch Studien belegt werden. In der Beeinflussung der Inflammation lässt sich eine anti-inflammatorische Tendenz des PZ ableiten. Somit kann aktuell festgehalten werden, dass beide Proteine die Koagulation beeinflussen und dass das PZ an inflammatorischen Interaktionen beteiligt ist. Dennoch sind weitere Studien nötig, um eine genauere Zuweisung der physiologischen Bedeutung zu ermöglichen.

### 1.3. Ziele der Studie

Die Grundlage der septischen Pathophysiologie liegt in einer systemischen Reaktion eines Organismus auf eine Infektion mit Aktivierung der Inflammation und Koagulation bis hin zu einer Immunparalyse, DIC und Störungen der Mikrozirkulation. Diese Veränderungen können von einer Organdysfunktion bis hin zu einem Multiorganversagen führen. Trotz adäquater Therapie geht die Sepsis mit einer hohen Mortalität einher. Neue Therapieoptionen könnten zu einer Senkung der Sterberate beitragen und somit das Überleben septischer Patienten verbessern. Dabei könnten therapeutische Mittel, wie z.B. das rekombinante aktivierte Protein C, die sowohl die Inflammation als auch die Koagulation modulieren, einen Vorteil darstellen. Das PZ und das ZPI sind beide involviert in das Gerinnungsgeschehen. Über eine inflammatorische Potenz gibt es nur wenige Belege.

Ziel der Studie war daher die Untersuchung der Eigenschaften einer PZ- und ZPI-Defizienz anhand eines murinen *knock-out* Modells sowie nach Induktion einer generalisierten Schwartzman Reaktion (GSR) als Modell einer Sepsis. Wir stellten uns in der vorliegenden Arbeit somit folgende Fragen:

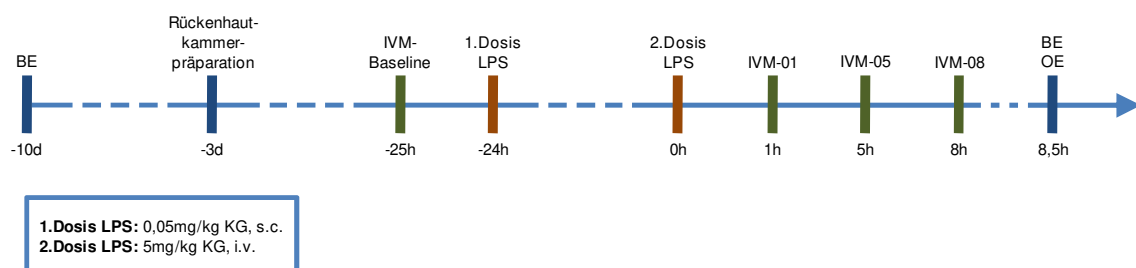
- Welche Veränderungen hinsichtlich der Inflammation, Mikrohämodynamik und Mikrozirkulation ergeben sich während einer GSR?
- Inwieweit stimmen die Eigenschaften einer GSR mit der Pathophysiologie einer Sepsis überein?
- Welche Veränderungen ergeben sich durch eine PZ-Defizienz im Verlauf einer GSR?
- Welche Veränderungen ergeben sich durch eine ZPI-Defizienz im Verlauf einer GSR?
- Inwieweit unterscheiden sich eine PZ- und ZPI-Defizienz im Verlauf der GSR?
- Welche Rückschlüsse lassen sich aus den Ergebnissen für das PZ und das ZPI ziehen?

## 2. Material und Methoden

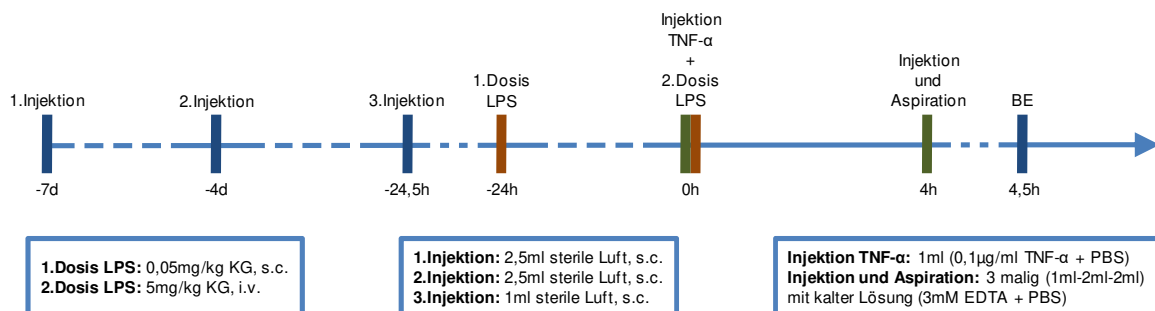
### 2.1. Modell-Übersicht

Die Untersuchungen der Eigenschaften von Protein Z (PZ) und dem Protein Z-abhängigen Protease-Inhibitor (ZPI) erfolgte anhand von 2 *knock-out* Maus-Modellen, dem dorsalen Rückenhautkammer- sowie dem *Air-Pouch*-Modell. In beiden Modellen wurde eine inflammatorische Reaktion des Organismus mithilfe der Schwartzman-Reaktion herbeigeführt. Eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf geben die beiden Abbildungen (Abb. 7).

A



B



**Abb. 7:** Vereinfachte und schematische Übersicht über den experimentell-zeitlichen Ablauf des dorsalen Rückenhautkammer- (A) und *Air-Pouch*-Modells (B). Blutentnahme (BE), intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM), Lipopolysaccharide (LPS), Organentnahme (OE), Tumornekrose-faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), subkutane Injektion (s.c.), intravenöse Injektion (i.v.), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), *phosphate buffered saline* (PBS).

### 2.2. Experimentelle Modelle

#### Versuchstiere

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden männliche, 10-26 Wochen alte und 20-35g schwere Mäuse verwendet. Die Versuchstiere wurden uns von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Broze von *Barnes-Jewish Hospital at Washington University School of Medicine* zur Verfügung gestellt und in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock weiter gezüchtet. Unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter *ad libitum* wurden die Versuchstiere in einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten. In Anlehnung an die Stu-

dien von Yin et al. und Zhang et al., haben unsere verwendeten Versuchstiere einen C57Bl/6x129 Hintergrund und wurden ebenfalls mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genotypisiert {Yin et al. 2000, Zhang et al. 2008}. Das Versuchsvorhaben war gemäß §8 des Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen 7221.3-1.1-072/11) genehmigt.

## Versuchsgruppen

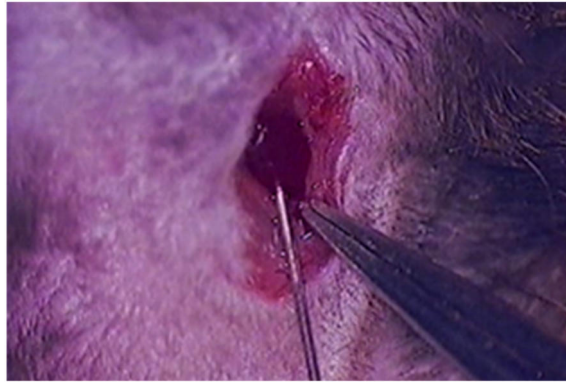
In beiden experimentellen Modellen wurden 3 Versuchsgruppen gebildet. Diese bestanden aus einer PZ- (PZko) und ZPI-*knock-out* (ZPIko) sowie einer Wildtyp-Gruppe (WT). Für die Auswertung wurde jeweils die PZko bzw. ZPIko zu den WT-Versuchstieren verglichen. Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendete Tieranzahl.

	Rückenhautkammer-Modell	<i>Air-Pouch</i> Modell
WT	9	8
PZko	8	6
ZPIko	6	6

**Tabelle 6:** Übersicht über die Anzahl der verwendeten Tiere innerhalb der experimentellen Modelle. Wildtyp (WT), Protein Z *knock-out* (PZko), Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor *knock-out* (ZPIko).

## Generalisierte Shwartzman Reaktion

Die GSR beinhaltet eine zweizeitige Exposition eines Organismus mit einem Agens zur Sensibilisierung des Immunsystems und späterer Induktion einer systemischen inflammatorischen Reaktion. In unseren Experimenten verwendeten wir das Lipopolysaccharid (LPS) von *Escherichia coli* (E. coli, Serotyp 0128/B12, Sigma-Aldrich, Deutschland). Dabei erfolgte die erste Injektion des LPS subkutan (0,05mg/kg KG), die zweite 24 Stunden später und intravenös mit einer um den Faktor 100 stärkeren Konzentration (5mg/kg KG) (siehe Abb. 7). Über eine kleine Hautinzision im rechten Halsbereich mit anschließender stumpfer Präparation wurde, für die intravenöse Verabreichung des LPS im Rückenhautkammer-Modell, die rechte *Vena Jugularis* präpariert. Im Anschluss erfolgte die Injektion des LPS in die Vene unter einem Operationsmikroskop (Leica M651) (siehe Abb. 8). Aufgrund der zeitlichen Abstimmung mit der TNF- $\alpha$  Injektion (siehe Abb. 7 B) wurde die intravenöse Gabe von LPS im *Air-Pouch*-Modell retrobulbär durchgeführt.



**Abb. 8:** Bild aus einer Videoaufnahme des Operationsmikroskops. Die Abbildung zeigt die intravenöse Applikation von LPS (5mg/kg KG) in die rechte Vena Jugularis.

## Anästhesie und Vorbereitung der Modell-Präparation

Die Versuchstiere wurden in beiden Modellen gewichtsadaptiert und intraperitoneal mit einer Mixtur aus Ketamin (75mg/kg KG; Ketamin 10%, bela-pharm GmbH Co. KG, Vechta) und Xylazin (5mg/kg KG; Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) anästhesiert. Zum Schutz vor einer Austrocknung der Augen wurde bei jeder Narkose eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgebracht. Des Weiteren wurde mithilfe einer kleinen, anatomischen Pinzette die Zunge der narkotisierten Maus leicht nach ventrolateral gezogen und mithilfe des Ober- und Unterkiefers in dieser Position fixiert. Dadurch sollten die Atemwege freigehalten und ein Zurückfallen der Zunge verhindert werden. Um eine Aspiration von Käfigstreu zu verhindern, wurde die narkotisierte Maus in dem Käfig auf ein Zellstoff-Tuch gebettet. In Vorbereitung für die Präparation einer Rückenhautkammer bzw. des *Air-Pouches* erfolgte in beiden Modellen eine Rasur des Rückenells der anästhesierten Maus mithilfe eines Elektrorasierers. Im Anschluss wurden die gekürzten Haare durch Einwirkung einer Enthaarungsmousse (pilca Enthaarungsmousse, DMV-Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG, Bad Pyrmont) epiliert.

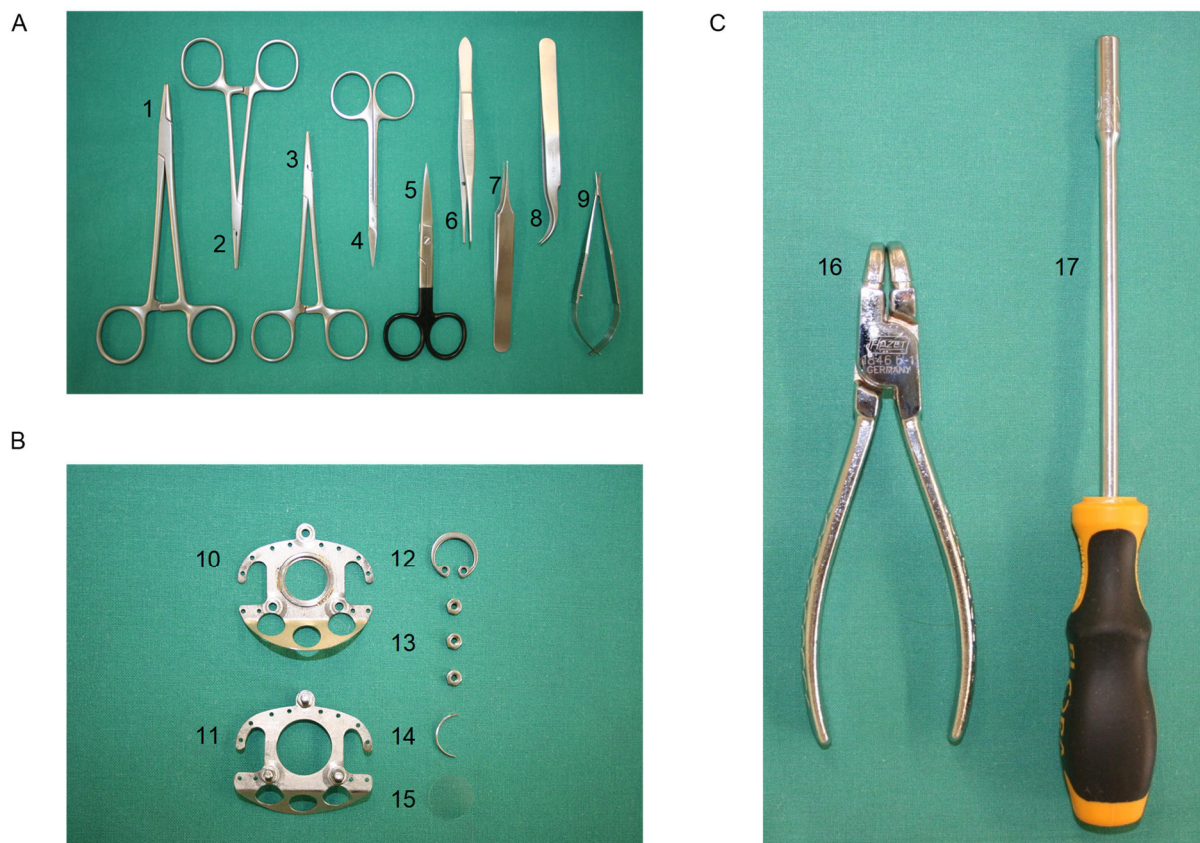
### 2.2.1. Modell der dorsalen Rückenhautkammer

#### Definition und Präparation

Für die Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Präparation einer dorsalen Rückenhautkammer. Bei diesem 1943 erstmals von Algire an der Maus angewandten und in den folgenden Jahrzehnten modifizierten Modell handelt es sich heute um eine etablierte Möglichkeit der intravitalen Darstellung der Mikrozirkulation {Menger et al. 2002, Vajkoczy et al. 2000, Lehr et al. 1993}.



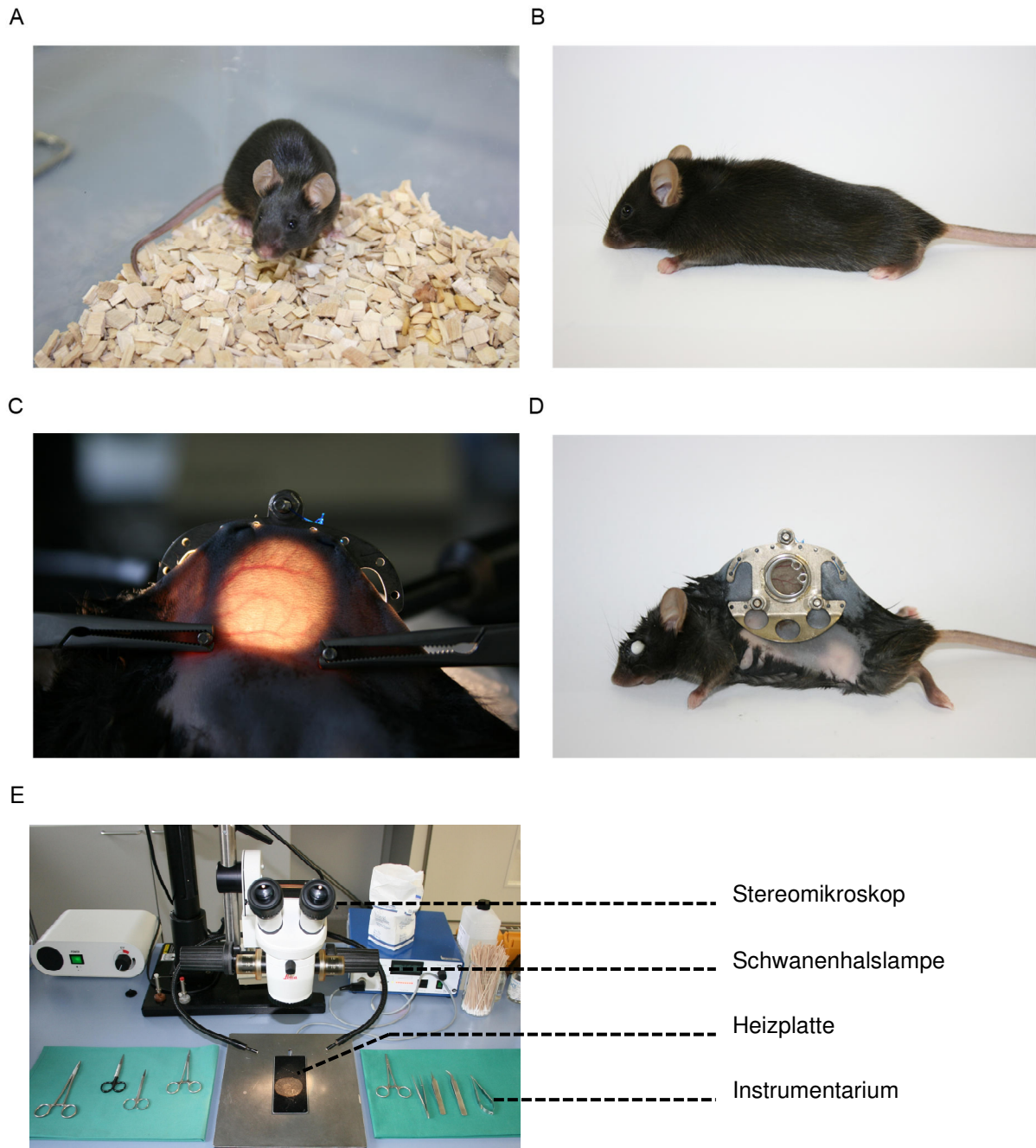
Eine dorsale Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titanplatten (siehe Abb. 9 B), zwischen denen die vorsichtig extendierte Rücken-Haut der narkotisierten Maus aufgespannt und befestigt wird. Eine Seite der doppelschichtigen Hautfalte wird bis auf das Gefäßniveau der gegenüberliegenden Seite präpariert und mit einem Deckglas abgedeckt. In der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können so verschiedene Gefäßparameter analysiert werden. Um hämodynamische und kapillare Parameter sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen während der GSR bewerten zu können, haben wir uns für das Modell der dorsalen Rückenhautkammer entschieden.



**Abb. 9:** Repräsentative Darstellung des Instrumentariums für eine Rückenhautkammer-Präparation: [A] 1-Nadelhalter, 2 und 3-Klemme, 4 und 5-feine Schere, 6-feine anatomische Pinzette, 7-mikrochirurgische Pinzette, 8-gebogene mikrochirurgische Pinzette, 9-mikrochirurgische Federschere, [B] 10-vordere Titan-Rückenhautkammerplatte, 11-hintere Titan-Rückenhautkammerplatte, 12-Sprengring, 13-Muttern zum Verschluss der Rückenhautkammerplatten, 14-Nadel, 15-rundes Deckglas, [C] 16-Sprengring-Zange, 17-Muttern-Dreher.

In der Vorbereitung wurden zunächst das Versuchstier gewogen und im Anschluss gewichtsadaptiert intraperitoneal anästhesiert. Nach etwa 5-10 Minuten erfolgten, an der nun narkotisierten Maus, die Rasur und das Epilieren des Rückenfalls (siehe Kapitel Anästhesie). Für die Präparation wurde die Maus zunächst auf eine Heizplatte gelegt zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C (siehe Abb. 10 E). Danach erfolgte unter Abdeckung des Kopfes eine Sprühdeseinfektion (octeniderm® farblos, Schülke &Mayr GmbH,

Norderstedt) der Rücken- und Halshaut. Anschließend wurde durch Diaphanoskopie mithilfe einer Schwanenhalslampe (Leica KL200) die mediane Linie der nach dorsal extendierten Rücken- und Halshaut bestimmt (siehe Abb. 10 C). Dabei war die Medianlinie eingestellt, wenn im Gegenlicht der Lampe die gegenüberliegenden, großen Gefäße der Hautfalte sich kongruent deckten.

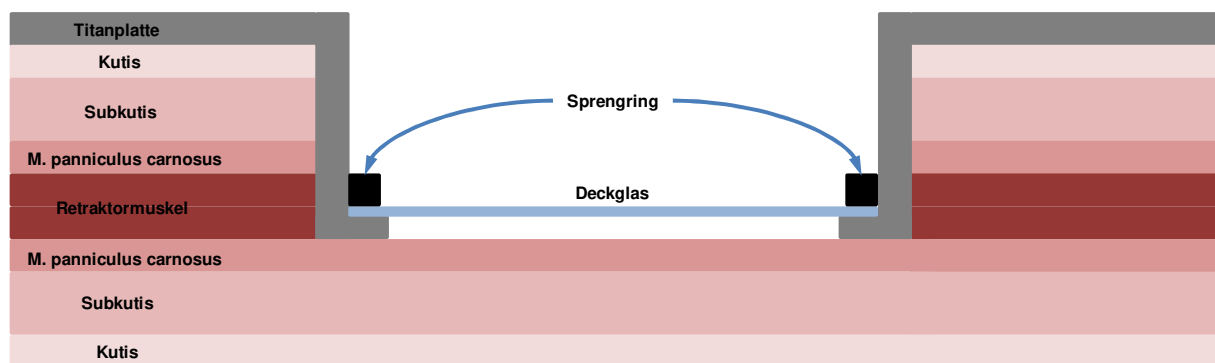


**Abb. 10:** Repräsentative Darstellung einzelner Schritte einer Rücken- und Halshautkammerpräparation: [A] Maus ohne Narkose, [B] narkotisierte Maus, [C] durchscheinende Gefäßzeichnung bei der Diaphanoskopie, [D] narkotisierte Maus nach Beendigung der Präparation, [E] operativer Arbeitsbereich.

Die nun ausgerichtete und extendierte Rücken- und Halshaut wurde über einen kranialen und einen kaudalen Haltefaden (3.5 Dermafil Green Polyester, SMI AG, Hünningen, Belgien) temporär an einem Fixierbügel befestigt. Im Anschluss wurde eine der Titanplatten an der kaudalen



Kante der Hautfalte in mittlerer Position durch 2 Nähte (4-0 Prolene, Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico, USA) fixiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die großen von kranial und kaudal kommenden Gefäße nicht durch die Position der Titanplatte und deren Schrauben beeinflusst werden, da ansonsten die Blutzirkulation in der Rückenhautkammer zum Erliegen kommen konnte. Unter Zuhilfenahme einer Hautschere wurden am ventralen Ende der extendierten Rückenhaut zwei Löcher durch beide Hautschichten hindurch präpariert. Durch diese wurden die beiden ventralen Verbindungsschrauben der Titanplatte geführt und mit zwei Klemmen fixiert. Anschließend erfolgte erneut durch Diaphanoskopie eine kreisrunde Markierung des zu präparierenden Hautareals mit einem Durchmesser von ca. 10 bis 15mm. Darauf erfolgte eine Umlagerung des Versuchstieres auf die Seite sowie eine Desinfektion des markierten Areals. Innerhalb der Markierung wurde nun mithilfe eines Stereomikroskops mikrochirurgisch die Kutis, Subkutis, der M. panniculus carnosus sowie zwei Schichten des Retraktormuskels vollständig exzidiert bis zum M. panniculus carnosus der Gegenseite. Somit blieb das Gewebe der Kammergegensseite vollständig erhalten (siehe Abb. 11).



**Abb. 11:** Vereinfachte und schematische Darstellung einer präparierten Rückenhautkammer. {Laschke et al. 2011}

Um Austrocknungen zu vermeiden, wurde während der Präparation die Exzisionsfläche mit 0,9% Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) kontinuierlich benetzt. Kleinere Blutungen wurden mit feuchten Wattestäbchen gestillt. Nach Beendigung der Präparation wurde die Exzisionsfläche großzügig mit 0,9% NaCl gespült. Darauf folgte das Aufstecken der anderen Titanplatte auf die drei Schrauben der bereits befestigten Platte. Unter leichtem Druck wurde so die Platte entlang der Schrauben in Richtung der Präparationsfläche gedrückt, um dort mit drei Muttern positioniert und befestigt zu werden. Im Anschluss wurde die präparierte Fläche erneut großzügig mit 0,9% NaCl gespült und ein Deckglas über diese angebracht. Das Deckglas wurde mit einem Sprengring in der Titanplatte fixiert (siehe Abb. 10 D). Zum Abschluss erfolgten noch zwei weitere Nähte an der kranialen und kaudalen Kante der beiden Titanplatten zur weiteren Befestigung des dorsalen Endes der Hautfalte. Die Maus wurde nun 72 Stunden unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter *ad libitum* in einem 12

Stunden Tag-/Nachtrhythmus gehalten, bevor die 2. Dosis LPS i.v. verabreicht und eine systemische inflammatorische Reaktion hervorgerufen wurde (siehe Abb. 7 A).

Ergänzend sei erwähnt, dass die beiden Titanplatten nicht direkt aneinander auflagen, sondern durch drei Muttern zwischen den Platten auf Abstand gehalten wurden, um einen ausreichenden Kompressionsschutz des Gewebes zu gewährleisten

### Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

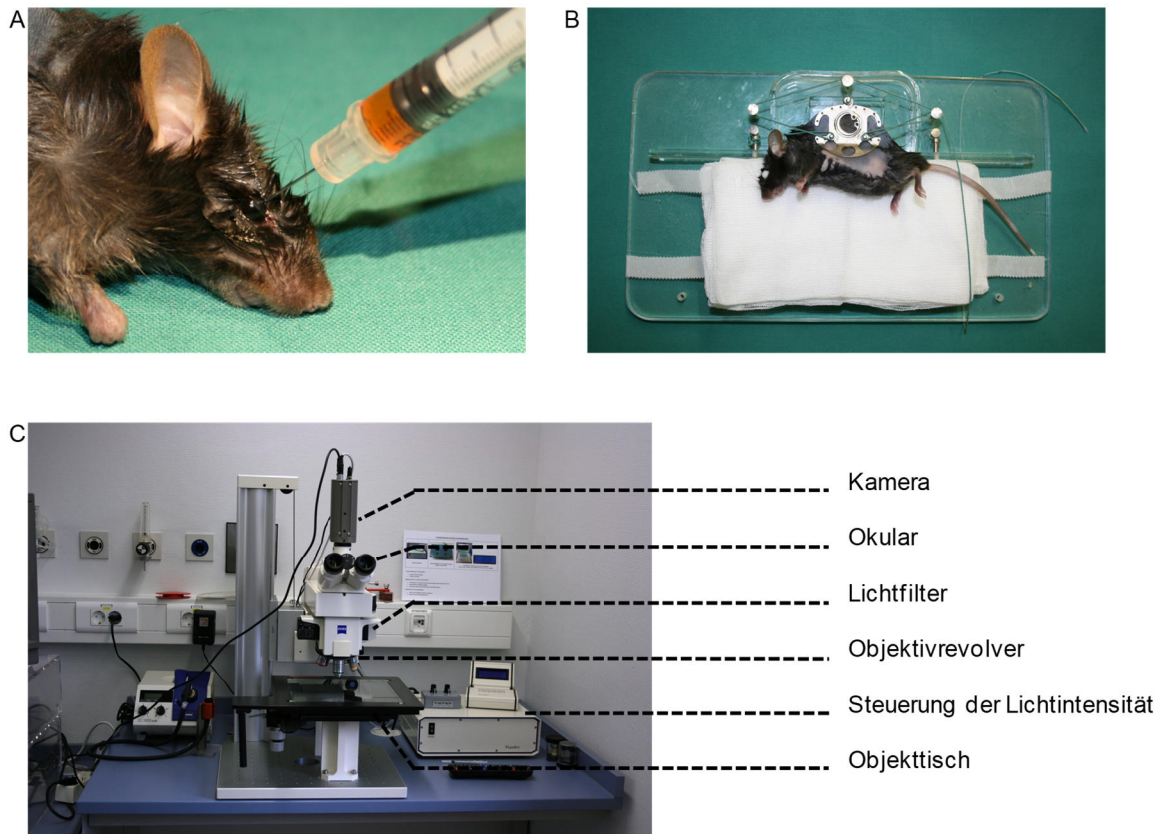
Um die Parameter der Mikrozirkulation zu erfassen, wurde eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) durchgeführt. Dabei wurden mithilfe fluoreszierender Farbstoffe das Blutplasma und die Leukozyten angefärbt. Durch ein Licht spezieller Längenwelle konnten somit unter dem Mikroskop (Axiotech Vario 100; Zeiss; Göttingen) die unterschiedlichen Farbstoffe getrennt voneinander angeregt und damit sichtbar gemacht werden. Die *Live*-Bilder der Gefäße wurden dabei über eine Schwarz-Weiß-CCD-Videokamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin) aufgenommen und mit einem Videorekorder (Panasonic Video Cassette Recorder AG-7350, Matsushita, Tokyo, Japan) auf Videokassette für die spätere *offline* Analyse am CapImage gespeichert.

Nach Präparation der Rückenhautkammer am Tag -3 (-3d) erfolgte die *Baseline* IVM-Aufnahme 25 Stunden vor i.v. Applikation der 2. Dosis LPS (-25h). Am darauffolgenden Tag wurden erneute IVM-Aufnahmen 1 (1h), 5 (5h) sowie 8 (8h) Stunden nach der intravenösen Gabe von LPS angefertigt (siehe Abb. 7 A).

Zur Vorbereitung der IVM erfolgte zuerst eine Anästhesie des Versuchstieres. Unter Narkose wurde ein Gemisch aus 2%igen Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran 2%, MG: 150 kD, Sigma-Aldrich, Deutschland) und 1%igen Rhodamin (Sigma-Aldrich, Deutschland) im Verhältnis von 1:1 in den retrobulbären Venenplexus injiziert (siehe Abb. 12 A). Das FITC-Dextran diente dabei zur Färbung des Blutplasmas, das Rhodamin zur Färbung der Leukozyten. Die Menge des verabreichten Gemisches wurde in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Gabe adaptiert (-25h: 0,1ml / 1h: 0,1ml / 5h: 0,08ml / 8h: 0,06ml).

Nach der retrobulbären Injektion des Farbstoffes wurde das Versuchstier seitlich auf einen speziellen Objektträger gelegt und die Rückenkammer mit einem Faden fixiert (siehe Abb. 12 B). Anschließend wurde der Objektträger zusammen mit dem Versuchstier auf den Objektisch des Mikroskops gelegt und die Rückenhautkammer im Okular eingestellt. Durch verschiedene Filtersysteme konnte das von der Quecksilberdampf-Kurzbogen-Lampe (HBO 103 W/2, Zeiss, Göttingen) ausgestrahlte Licht auf bestimmte Wellenlängen eingestellt werden. Das durch den Filter hindurch gelassene Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs war nun in der Lage den Fluoreszenzfarbstoff anzuregen. Der angeregte Farbstoff emittierte daraufhin ein Licht anderer Wellenlänge, welches nun erneut durch einen Filter heraus selek-

tiert und im Okular dadurch sichtbar gemacht wurde. Mithilfe des blauen Filters (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 450-490/>520nm) konnte somit das Blutplasma durch die Anregung von FITC-Dextran sichtbar gemacht werden. Durch den grünen Filter (Exzitations-/Emissionswellenlänge: 530-560/>580nm) konnten die durch Rhodamin gefärbten Leukozyten dargestellt werden.



**Abb. 12:** Vorbereitung und Aufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie: [A] intravenöse, retrobulbäre Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe, [B] Positionierung der narkotisierten Maus auf eine Fixationsplatte, [C] vereinfachter Aufbau des intravitalen Fluoreszenzmikroskops.

Für jedes Versuchstier wurden in der *Baseline* IVM-Aufnahme (-25h) 6-8 Arteriolen und 6-8 Venolen mit einem Durchmesser von 30-60 $\mu$ m sowie insgesamt 5 Kapillarfelder aufgesucht und aufgenommen. Die gleichen Arteriolen und Venolen wurden am Tag der i.v. LPS-Applikation nach 1, 5 und 8 Stunden erneut aufgesucht und auf Videokassette gespeichert. Sämtliche Aufnahmen zur späteren *offline* Analyse wurden mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv durchgeführt (Luc Plan FLN x20/0.45 W, Olympus).

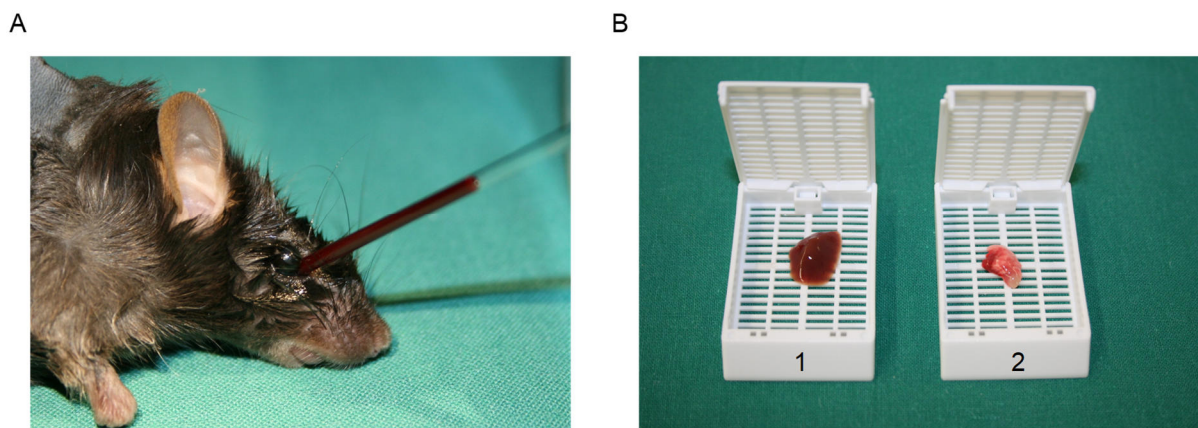
## Blutabnahme

Zur Blutanalyse wurden bei den Versuchstieren jeweils zwei Blutentnahmen (BE) durchgeführt. Die erste Blutabnahme erfolgte mindestens zehn Tage (-10d) vor, die zweite 8,5 Stunden nach der i.v. LPS-Applikation (siehe Abb. 7 A). Beide Blutabnahmen wurden unter Nar-

kose und retrobulbär (siehe Abb. 13 A) mithilfe einer Kapillare (Sarstedt, Nümbrecht) sowie einem EDTA-Blutröhrchen (Microvette®, Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt.

### Organasservierung und Versuchsende

8,5 Stunden nach der i.v. LPS-Applikation und der zweiten Blutabnahme erfolgte die Tötung des Versuchstieres durch eine retrobulbäre, intravenöse Gabe einer Überdosis des Narkosemittels. Kurz darauf wurden durch eine mediane Thorako- bzw. mediane Laparotomie sowohl die Lungen als auch die Leber entnommen. Teile der Organe wurden anschließend in Histokassetten gelegt (siehe Abb. 13 B) und für 1-2 Tage in einer 4%igen Formalin-Lösung (Formafix 4% gepuffert, Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow) aufbewahrt. Des Weiteren wurden in gleicher Technik in insgesamt 9 weiteren unbehandelten Mäusen (3 WT, 3 PZko, 3 ZPIko) die Leber und Lunge entnommen, um histologische *Baseline*-Werte dieser Gruppen zu ermitteln.



**Abb. 13:** [A] Retrobulbäre Blutabnahme bei einer narkotisierten Maus, [B] Entnommene Organe (1- Leber, 2-Lunge) in histologischen Kassetten vor der Formalin-Einbettung.

### 2.2.2. Air-Pouch Modell

#### Definition und Präparation

Ein *Air-Pouch* ist eine künstlich geschaffene und subkutane Luftkammer (siehe Abb. 14 A). Nach Injektion eines Lockstoffes in die Kammer kann anschließend die leukozytäre Extravasation durch Injektion und Aspiration einer Spüllösung bestimmt werden. Um nun das Extravasationsverhalten der Leukozyten während der Schwartzman Reaktion analysieren zu können, nutzten wir das *Air-Pouch* Modell. Es wurden dabei einige Abläufe und Erkenntnisse des *Air-Pouch* Versuches von Schramm et al. übernommen und modifiziert {Schramm et al. 2000}.

Sieben Tage vor der i.v. Applikation der 2. Dosis LPS (-7d) wurde mit der Präparation des *Air-Pouches* begonnen. Dabei wurde in der Vorbereitung das Versuchstier anästhesiert und anschließend der Rücken rasiert sowie epiliert. Nach Sprühdesinfektion folgte nun die erste, subkutane Injektion (1. Injektion) von 2,5ml steriler Luft. Dieser Ablauf wurde am Tag -4 (-4d) wiederholt, wobei die 2,5ml sterile Luft diesmal in die bereits existierende Luftkammer subkutan injiziert wurde. 24,5 Stunden vor der 2. Dosis LPS (-24,5h) erfolgte die letzte Injektion (3. Injektion) von nur 1ml steriler Luft in den *Air-Pouch* (siehe Abb. 7 B). Die über eine Woche verteilten Luft-Injektionen dienten dabei zur Aufrechterhaltung eines Volumens des *Air-Pouches* und zur Gewebeorganisation der Kammerhülle, sodass am Tag der i.v. LPS-Applikation problemlos der leukozytäre Lockstoff in Stunde 0 (0h) sowie die Injektion und Aspiration der Spüllösung in Stunde 4 (4h) erfolgen konnte.

### **TNF- $\alpha$ Injektion und Zell-Aspiration**

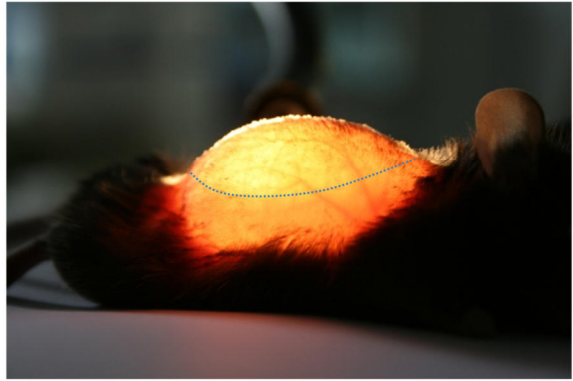
Um während der Schwartzman Reaktion eine Leukozyten-Extravasation hervorzurufen, wurde TNF- $\alpha$  in den *Air-Pouch* am Tag 0 injiziert. Die 1ml Injektions-Lösung beinhaltete TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , from mouse*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit 0,1 $\mu$ g/ml sowie *phosphate buffered saline* (PBS, gibco®, life technologies™, Paisley, UK). Die Konzentration von TNF- $\alpha$  wurde aufgrund der Studienergebnisse von Schramm et al. {Schramm et al. 2000} gewählt, da bei dieser Konzentration die höchste Leukozyten-Extravasation nach 4 Stunden beobachtet werden konnte. Der Erfolg der TNF- $\alpha$  Injektion konnte durch die Beobachtung eines Flüssigkeitsspiegels im *Air-Pouch* mithilfe der Diaphanoskopie überprüft werden (siehe Abb. 14 B). Direkt nach der Injektion erfolgte die gewichts-adaptierte, retrobulbäre Applikation der 2. Dosis LPS (5mg/kg KG, i.v.). Nach 4 Stunden Schwartzman Reaktion erfolgte 3-malig (1ml-2ml-2ml) die Injektion mit anschließender Aspiration einer kalten Spüllösung bestehend aus 3mM EDTA (Merck, Darmstadt) und PBS. Die sich in dem *Air-Pouch* gesammelten und in der Spüllösung schwimmenden Leukozyten konnten so aspiriert und in *Falcon*-Röhrchen (15ml Tube, greiner bio-one, Solingen) zur weiteren Verarbeitung gesammelt werden.



A



B



**Abb. 14:** [A] *Air-Pouch* auf dem Rücken einer narkotisierten Maus nach 3-maliger Injektion (-7d: 2,5ml, -4d: 2,5ml, -24,5h: 1ml) von steriler Luft. [B] Mithilfe der Diaphanoskopie erkennbarer (-) Flüssigkeitsspiegel in einem *Air-Pouch* einer anästhesierten Maus nach Injektion von 1ml einer Lösung aus TNF- $\alpha$  und PBS.

### Blutabnahme und Versuchsende

Nach Injektion und Aspiration der Spüllösung im *Air-Pouch* erfolgte an der narkotisierten Maus eine retrobulbäre Blutabnahme mithilfe einer Kapillare (Sarstedt, Nümbrecht) sowie einem EDTA-Blutröhrchen (Microvette®, Sarstedt, Nümbrecht). Anschließend wurde das Versuchstier durch eine intravenöse Überdosierung des Narkosemittels getötet.

### 2.3. Datenerhebung

#### Blut- und Serumanalyse

In beiden experimentellen Modellen wurde das abgenommene Blut hinsichtlich der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten mithilfe eines automatischen Analysesystems (Sysmex KX21, Sysmex, Deutschland GmbH, Norderstedt) untersucht. Zusätzlich erfolgte im Rücken-hautkammer-Modell im Anschluss eine Zentrifugierung des Blutes bei 3500 U/min für 10 Minuten und darauffolgend eine Pipettierung des überstehenden Blutplasmas zur Analyse der Interleukin-10 (IL-10) Werte. Die IL-10 Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit von *Thermo Fisher Scientific* (Rockford, Illinois 61101, USA) durchgeführt.

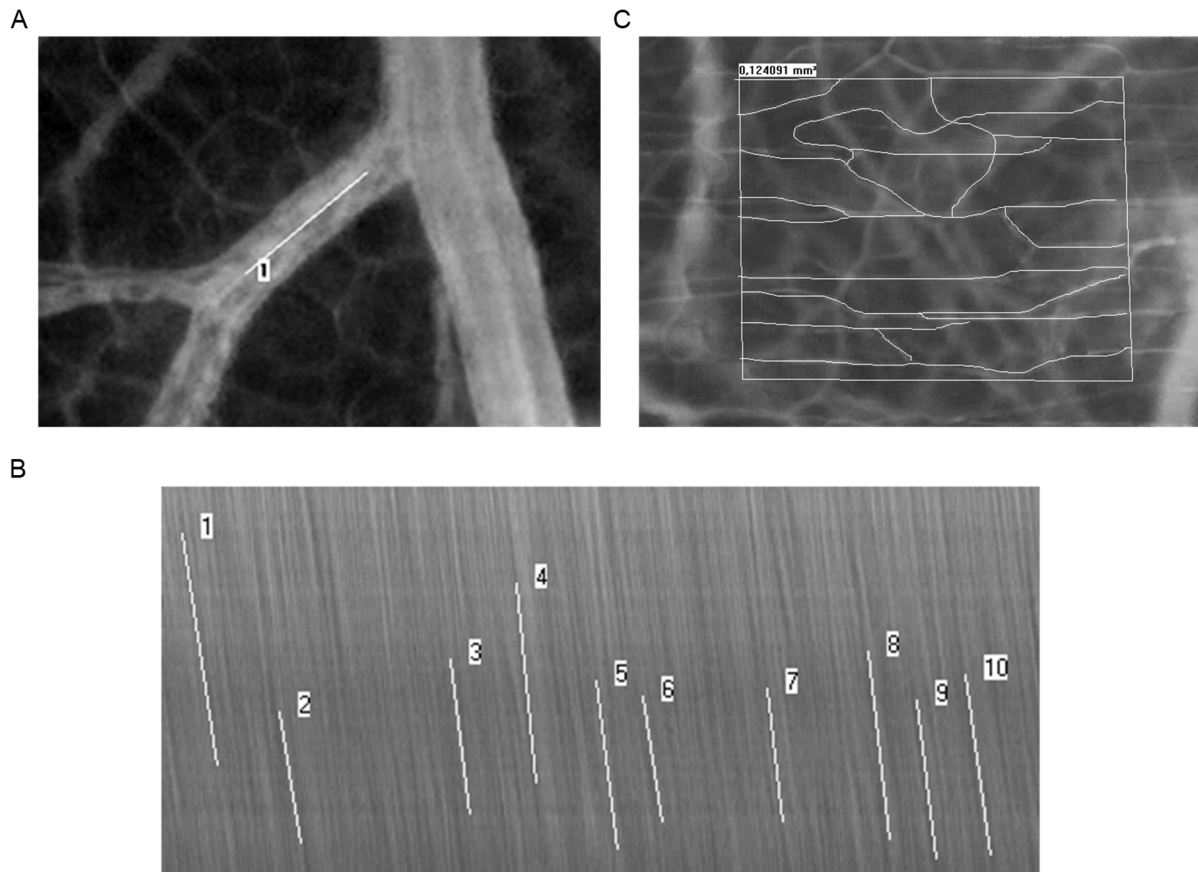
#### Analyse der Mikrozirkulation

Die mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie auf Video aufgenommenen Gefäße wurden später *offline* am Computer analysiert. Hierfür wurde ein spezielles Programm (*CAPIMAGE*, Dr. Zeintl Software, Heidelberg) genutzt. Durch die Färbung des Blutplasmas mit FITC-Dextran und Anregung im blauen Lichtbereich konnten Gefäßparameter wie der

volumetrische Blutfluss, die Wandscherrate, die funktionelle kapilläre Dichte sowie die *Leakage* bestimmt werden. Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten konnte durch eine Färbung mit Rhodamin und Anregung im grünen Lichtbereich analysiert werden.

**Bestimmung des volumetrischen Blutflusses [pl/s] (VBF):** Zur Bestimmung des volumetrischen Blutflusses wurde zunächst die Blutflussgeschwindigkeit (*velocity*, **v** in [mm/s]) bestimmt. Dafür wurde innerhalb des *CAPIMAGE* eine Gerade in die Mitte des zu untersuchenden Gefäßes gelegt (siehe Abb. 15 A). Unter laufendem Videoband analysierte das Programm über 10 Sekunden für jeden Punkt der Geraden die Veränderungen der Grauwerte und stellte diese in einem Zeit-Weg-Diagramm dar (siehe Abb. 15 B). Die Grauwertveränderungen resultierten dabei aus dem Fluss der dunkel erscheinenden Erythrozyten in dem gefärbten Blutplasma. Durch das manuelle Einlegen von mindestens 10 Geraden in das Diagramm erfolgte über Anstieg-Berechnung und Mittelwertbildung die Angabe der mittleren Blutflussgeschwindigkeit (siehe Abb. 15 B). Des Weiteren musste zur Bestimmung des VBF der mittlere Gefäßdurchmesser (**d** in [mm]) des gewählten Gefäßabschnittes bestimmt werden. Dies erfolgte durch das Einlegen von mehreren Geraden entlang des gesamten Gefäßabschnittes und anschließender Mittelwertbildung. Um den Unterschied zwischen Blutflussgeschwindigkeit im Zentrum eines Gefäßes gegenüber dessen Randbereich auszugleichen, wurde ein Baker-Wayland-Faktor von 1,6 verwendet. So konnte nun der VBF in [mm<sup>3</sup>/s] berechnet werden über die Gleichung:

$$\text{VBF} = v / 1,6 \times (\pi \times d^2) / 4$$



**Abb. 15:** Repräsentative Darstellung der Messungen einiger Gefäßparametern im *CAPIMAGE*: [A] Einlegen einer Geraden in die Gefäßmitte zur Blutflussgeschwindigkeitsbestimmung, [B] Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit durch Mittelwertbildung der Anstiege von mindestens 10 eingelegten Geraden, [C] Bestimmung der funktionellen kapillären Dichte.

**Bestimmung der Wandscherrate [1/s] (WSR):** Durch die Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit ( $v$  in [mm/s]) und des mittleren Gefäßdurchmessers ( $d$  in [mm]) konnte auch die Wandscherrate über folgende Gleichung berechnet werden:

$$WSR = 8 \times (v/1,6)/d$$

**Bestimmung der funktionellen kapillären Dichte [cm/cm<sup>2</sup>] (FCD):** Für die Bestimmung der funktionellen kapillären Dichte wurde innerhalb der aufgenommenen Kapillarfelder eine manuell bestimmte Flächengröße im *CAPIMAGE* markiert. Durch Abspielen der *Live*-Bilder konnten nun innerhalb der markierten Fläche ebenfalls manuell die perfundierten Kapillaren nachgezeichnet werden (siehe Abb. 15 C). Über eine Flächenberechnung wurden so die perfundierten Kapillaren in cm pro cm<sup>2</sup> Fläche angegeben.

**Bestimmung der *Leakage*:** Als *Leakage* wird der Verlust von Blutplasma aus den Gefäßen in das perivaskuläre Gewebe bezeichnet. Die *Leakage* wurde im *CAPIMAGE* durch eine Grauwertbestimmung berechnet. Dafür wurde ein Verhältnis gebildet aus dem mittleren ext-



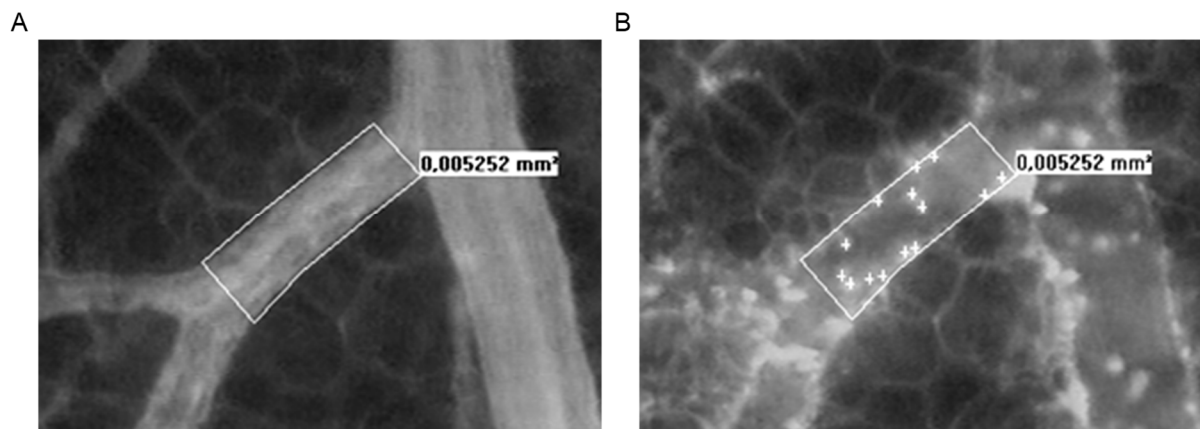
ravasalen Grauwert ( $G_{\text{extra}}$ ) einer manuell bestimmten Fläche zu dem mittleren intravasalen Grauwert ( $G_{\text{intra}}$ ) einer Fläche. Somit ergibt sich die *Leakage* aus:

$$Leakage = G_{\text{extra}}/G_{\text{intra}}$$

**Bestimmung der adhärenenten Leukozyten [ $n/\text{mm}^2$ ]:** Um die Anzahl der adhärenenten Leukozyten zu bestimmen, wurde als erstes die beobachtete Gefäßfläche ermittelt. Durch Bestimmung des mittleren Gefäßdurchmessers ( $d$  in [mm], siehe Bestimmung des VBF) sowie der Länge des Gefäßes ( $h$  in [mm]) konnte unter Annahme einer idealen kreiszylindrischen Form des Gefäßes die Gefäßfläche ( $A$  in [ $\text{mm}^2$ ]) berechnet werden aus:

$$A = \pi \times d \times h$$

Nach Berechnung der Fläche wurden die Grenzen des Gefäßabschnittes markiert und die adhärenenten Leukozyten gezählt. Dabei war ein Leukozyt adhärenent, wenn er in einer 20 Sekunden laufenden Videosequenz seine Position nicht veränderte. Die gezählten Leukozyten wurden im Anschluss auf die berechnete Fläche bezogen und in [ $n/\text{mm}^2$ ] angegeben.



**Abb. 16:** Repräsentative Darstellung der Messung von adhärenenten Leukozyten im *CAPIMAGE*: [A] Begrenzung des Gefäßabschnittes, [B] Bestimmung adhärenenter Leukozyten nach Wechsel des Lichtfilters.

Abschließend sei erwähnt, dass die Bestimmung des VBF, der WSR, der *Leakage* und der adhärenenten Leukozyten sowohl in den Arteriolen als auch den Venolen durchgeführt wurde. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurde für die 6-8 analysierten Arteriolen bzw. 6-8 Venolen jeweils ein Mittelwert für die einzelnen Parameter pro Versuchstier gebildet. Ähnlich erfolgte die Mittelwertbildung für jeden gemessenen Zeitpunkt eines Versuchstieres durch die jeweils 5 analysierten funktionellen kapillären Dichten.

## Histologische Analysen

Die im Rückenhautkammer-Modell sowie zur histologischen *Baseline*-Bestimmung entnommenen Organe (siehe Kapitel Organasservierung und Versuchsende) wurden direkt nach der Resektion in Histokassetten gelegt und für 1-2 Tage in einer 4%igen Formalin-Lösung (Formafix 4% gepuffert, Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow) aufbewahrt. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die abgekühlten Paraffin-Blöcke konnten nun in 5µm dünne Scheiben geschnitten und mit Chloracetatesterase (CAE) gefärbt werden. Die CAE-positiven Zellen (v.a. neutrophile Granulozyten) wurden in 40-facher Vergrößerung (Plan N 40x/0.65) mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Olympus BX51) untersucht. Dabei wurden für jeden Lungen- bzw. Lebergewebsschnitt eines Versuchstieres jeweils 25 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Nach 8,5 Stunden GSR wurde in den CAE gefärbten Leber-Gewebsschnitten zusätzlich die Anzahl der thrombosierten Gefäße bestimmt und ein Verhältnis gebildet zu der Gesamtzahl der Gefäße im histologischen Präparat.

## Neubauer Zählkammer

Die im *Air-Pouch* Modell mithilfe der Spüllösung gewonnenen Zell-Suspension wurde im Anschluss für 10 Minuten bei 1300 U/min und 19°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mithilfe einer Absaugvorrichtung entfernt und das übriggebliebene Pellet erneut resuspendiert unter Zuhilfenahme einer mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnten Facs®-Lysing Solution (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde die Suspension für 30 Minuten im Dunklen aufbewahrt und im Anschluss wieder für 10 Minuten bei 1300 U/min und 19°C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand mithilfe der Absaugvorrichtung entfernt und das Pellet mit 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung resuspendiert. Nun wurde die Neubauer Zählkammer mit dieser präparierten Suspension befüllt und die 4 Zählfelder ausgezählt. Durch Mittelwertbildung der 4 erhaltenen Werte und Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor konnte die Anzahl der Leukozyten in der aspirierten *Air-Pouch* Suspension pro ml angegeben werden.

## 2.4. Statistik

Sämtliche erhobene Daten wurden in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) gesammelt und weiterverarbeitet. Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte unter Anwendung von SigmaPlot® 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Aufgrund der geringen Gruppengrößen mit jeweils  $n < 20$  lag keine Normalverteilung vor, sodass sämtliche statistische Auswertungen durch nicht parametrische Testverfahren analysiert wurden. Um einzelne Parameter zwischen den *knock-out* Gruppen und der Wildtyp-Gruppe zu verglei-

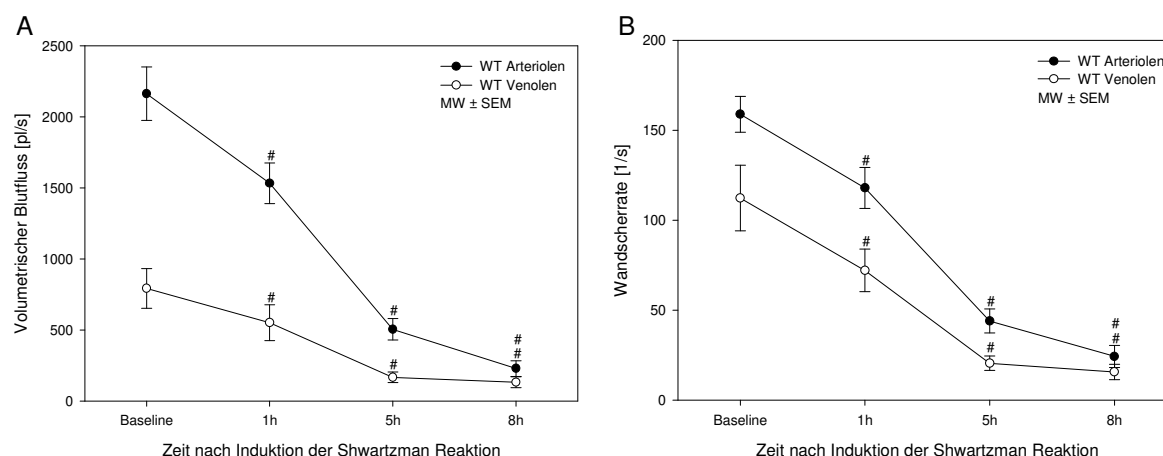
chen, wurde der Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit einer Bonferroni-Korrektur durchgeführt und signifikante Unterschiede durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet. In den statistischen Auswertungen der intravital-mikroskopisch erhobenen Daten wurden innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen verschiedene Zeitpunkte durch eine *Repeated measures ANOVA on ranks* mit einem sich anschließenden Student-Newman-Keuls-Test verglichen und die Signifikanzen durch eine Raute (#) markiert. Zwei Einzelwerte wurden - in Abhängigkeit von einer notwendigen Bonferroni-Korrektur - bei einem P-Wert  $<0,05$  als signifikant unterschiedlich bewertet. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte unter Angabe des Mittelwertes (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die Methodik der statistischen Datengenerierung erfolgte in Absprache mit dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung IBIMA (Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt). Die Durchführung sämtlicher Experimente erfolgte in verblindeter Form durch die Vergabe fortlaufender Nummerierungen, durchgeführt durch Herrn PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, mit anschließender Entblindung nach Datenerhebung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Eigenschaften der generalisierten Schwartzman Reaktion

Sämtliche Analysen bezüglich der GSR-Charakterisierung erfolgten innerhalb der Wildtyp-Versuchsgruppe (WT), indem die gemessenen Werte während bzw. am Ende der GSR jeweils zu den vor GSR-Induktion erhobenen *Baseline*-Ergebnissen verglichen wurden.

**Mikrohämodynamik:** Im Vergleich zu den *Baseline*-Werten konnte für den volumetrischen Blutfluss (VBF) sowie für die Wandscherrate (WSR) in den WT-Versuchstieren ein signifikanter Abfall der Parameter nach 1, 5 sowie 8 Stunden GSR in den Arteriolen und Venolen beobachtet werden (siehe Abb. 17 und Tabelle 7).

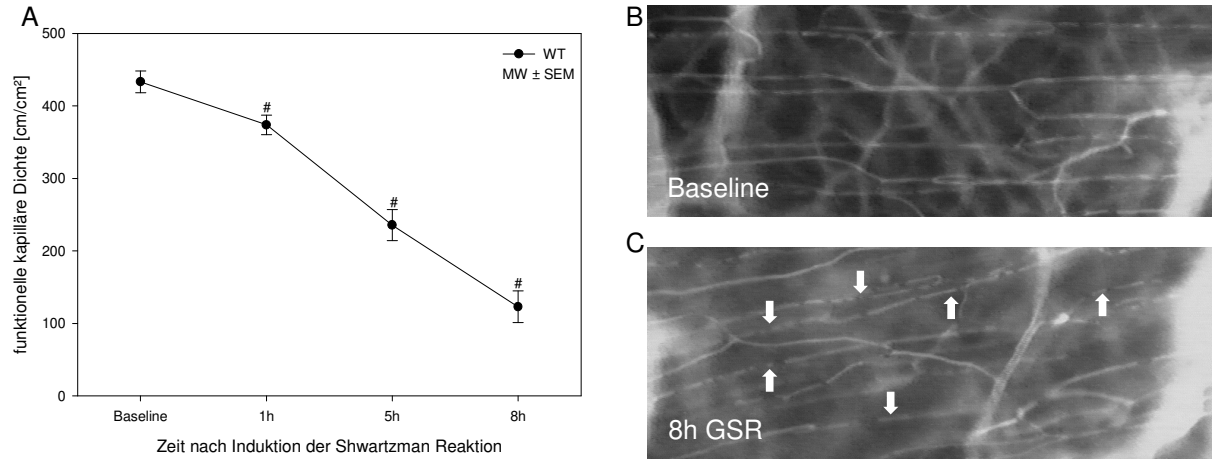


**Abb. 17:** Quantitative Analyse des volumetrischen Blutflusses [A] und der Wandscherrate [B] in Arteriolen und Venolen der Wildtyp-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*

WT	Baseline	1h	5h	8h
Volumetrischer Blutfluss [pl/s]				
Arteriolen	2162 $\pm$ 188	1532 $\pm$ 143 #	504 $\pm$ 75 #	229 $\pm$ 55 #
Venolen	793 $\pm$ 140	551 $\pm$ 126 #	167 $\pm$ 36 #	133 $\pm$ 38 #
Wandscherrate [1/s]				
Arteriolen	159 $\pm$ 10	118 $\pm$ 11 #	44 $\pm$ 7 #	24 $\pm$ 6 #
Venolen	112 $\pm$ 18	72 $\pm$ 12 #	21 $\pm$ 4 #	16 $\pm$ 4 #

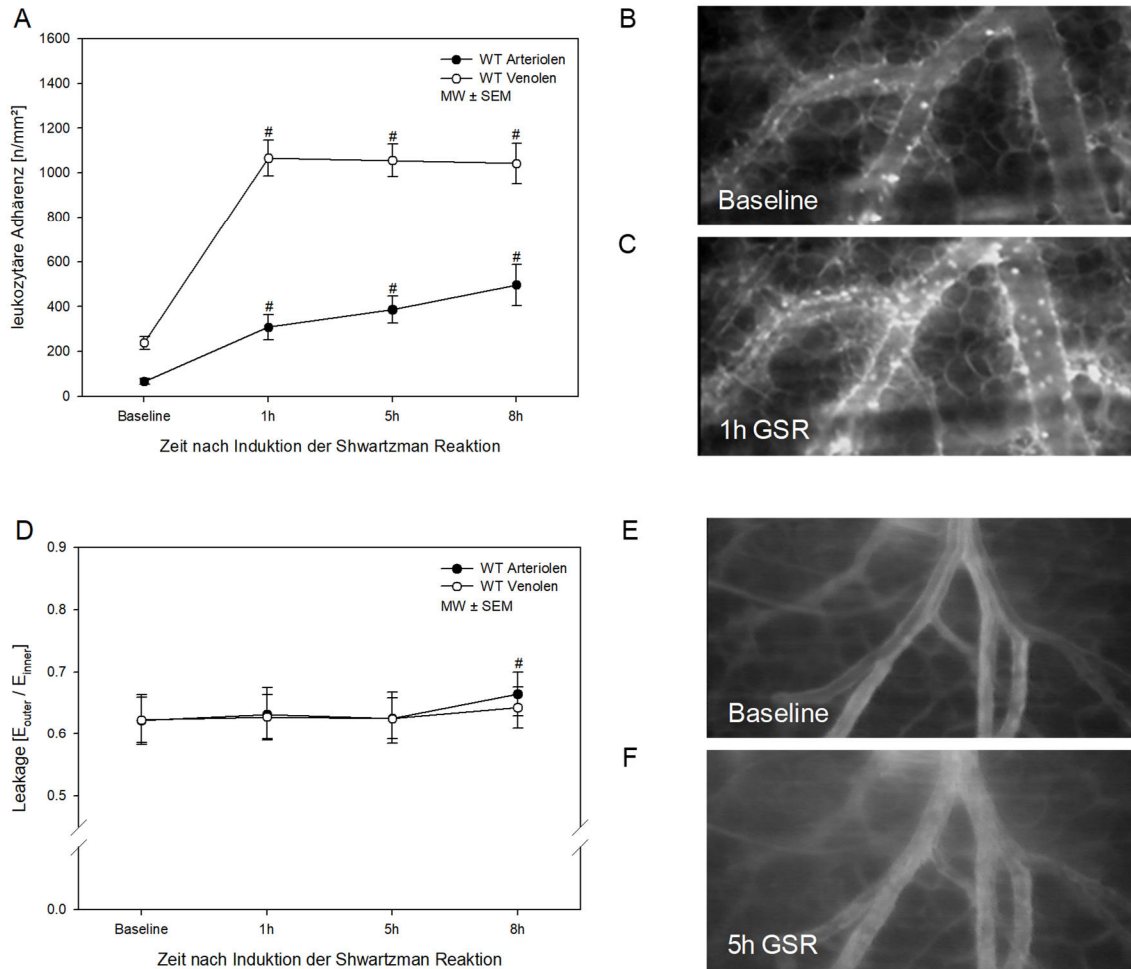
**Tabelle 7:** Tabellarische Übersicht über die im *CAPIMAGE* zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Mittelwerte in der WT-Gruppe hinsichtlich des volumetrischen Blutflusses und der Wandscherrate in Arteriolen und Venolen. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*

Ebenfalls konnte ein signifikanter Abfall der funktionellen kapillären Dichte (FCD) über die 8 Stunden GSR hinweg beobachtet werden (siehe Abb. 18; 1h:  $374 \pm 13 \text{ cm/cm}^2$  #, 5h:  $236 \pm 22 \text{ cm/cm}^2$  #; 8h:  $123 \pm 22 \text{ cm/cm}^2$  # vs. *Baseline*:  $433 \pm 15 \text{ cm/cm}^2$ ).



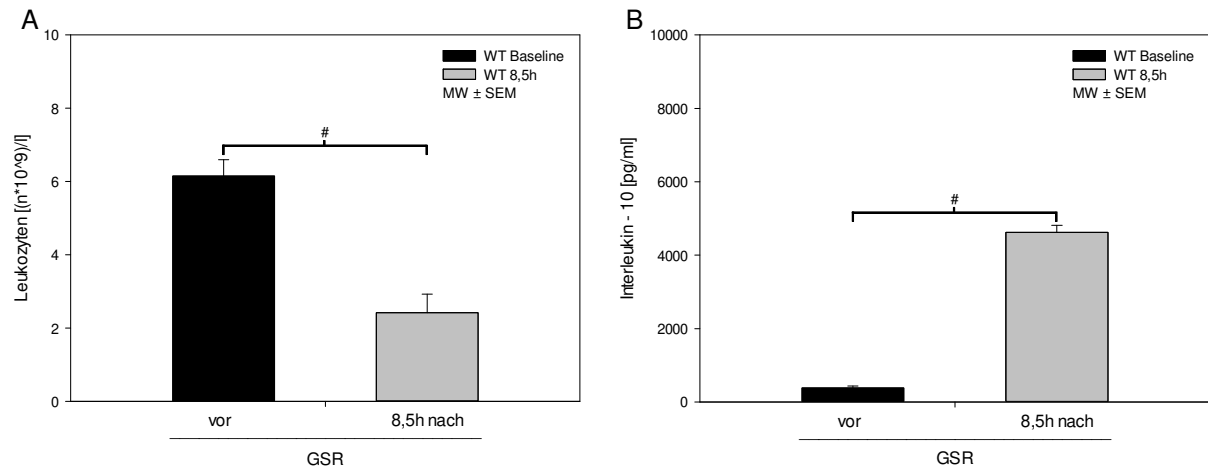
**Abb. 18:** Repräsentative, intravitalmikroskopische Bilder ([B] *Baseline*; [C] nach 8 Stunden GSR mit Kennzeichnung (Pfeil) der *stopped-flow* Kapillaren) sowie quantitative Analyse [A] der funktionellen kapillären Dichte der WT-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p*<0,05 vs. *Baseline*.

**Inflammation:** In den Analysen der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen wurden hinsichtlich der Inflammation signifikante Anstiege der leukozytären Adhärenz über die 8 Stunden GSR hinweg beobachtet (siehe Abb. 19 A-C; Arteriolen, 1h:  $308 \pm 56/\text{mm}^2$  #, 5h:  $386 \pm 60/\text{mm}^2$  #, 8h:  $496 \pm 91/\text{mm}^2$  # vs. *Baseline*:  $66 \pm 13/\text{mm}^2$ ; Venolen, 1h:  $1066 \pm 80/\text{mm}^2$  #, 5h:  $1056 \pm 73/\text{mm}^2$  #, 8h:  $1043 \pm 90/\text{mm}^2$  # vs. *Baseline*:  $238 \pm 29/\text{mm}^2$ ). Für die *Leakage* konnte eine signifikante Zunahme lediglich bei Stunde 8 der GSR in den Arteriolen gesehen werden (siehe Abb. 19 D-F: Arteriolen, 8h:  $0,66 \pm 0,04$  # vs. *Baseline*:  $0,62 \pm 0,04$ ). Diese Veränderung ist pathophysiologisch jedoch irrelevant, da eine relevante Manifestation erhöhter Gefäßpermeabilität erst ab Werten von >1 gegeben ist.



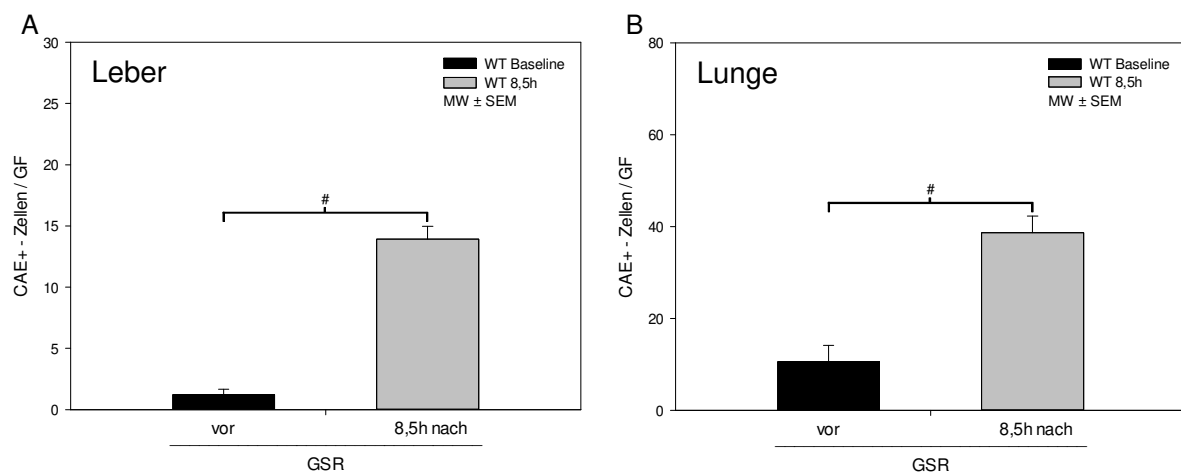
**Abb. 19:** Repräsentative, intravitalmikroskopische Bilder ([B, E] *Baseline*; [C] nach 1 Stunde GSR; [F] nach 5 Stunden GSR) sowie quantitative Analyse der leukozytären Adhärenz [A] sowie der *Leakage* [D] in Arteriolen und Venolen der WT-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*

In den Blutanalysen wurden nach 8,5 Stunden GSR eine deutliche Leukozytopenie (auf ca. 33%) sowie signifikant erhöhte Interleukin-10 (IL-10) Werte (um das 12-Fache) im Vergleich zu den 10 Tage zuvor abgenommenen Parametern festgestellt (siehe Abb. 20; Leukozyten, 8,5h:  $2 \pm 1 \cdot 10^9/l$  <sup>#</sup> vs. *Baseline*:  $6 \pm 0 \cdot 10^9/l$ ; IL-10, 8,5h:  $4620 \pm 197 \text{ pg/ml}$  <sup>#</sup> vs. *Baseline*:  $381 \pm 56 \text{ pg/ml}$ ).



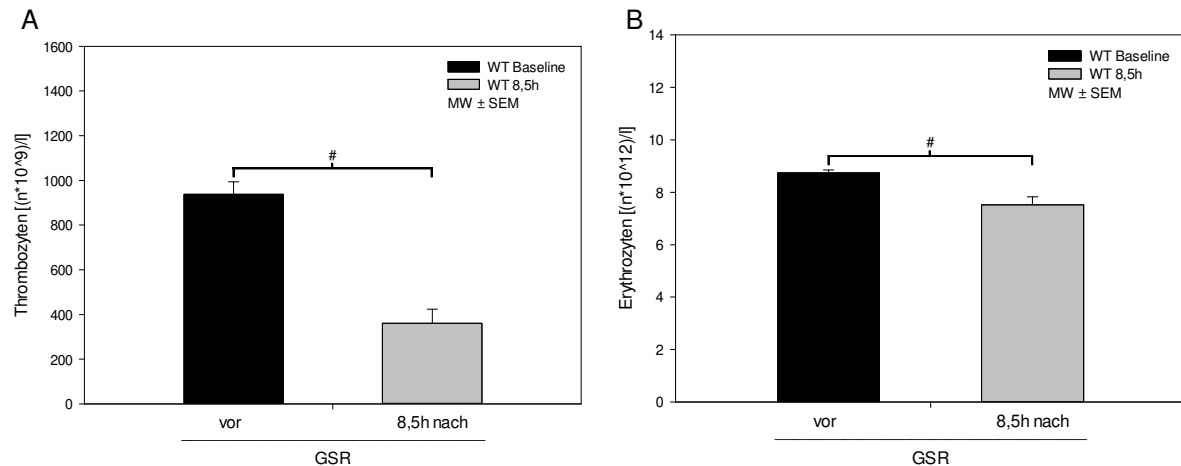
**Abb. 20:** Quantitative Analyse von systemischen Leukozyten [A] und Interleukin-10 [B] in der WT-Gruppe, vor (*Baseline*) und 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, # $p < 0,05$ .

In der histologischen Begutachtung der Leber und der Lunge wurden nach einer GSR mehr CAE-positive Zellen pro Gesichtsfeld (GF) gezählt im Vergleich zu den entnommenen Organen der unbehandelten WT-Versuchstiere (siehe Abb. 21; Leber, 8,5h:  $14 \pm 1/GF$  # vs. *Baseline*:  $1 \pm 0/GF$ ; Lunge 8,5h:  $39 \pm 4/GF$  # vs. *Baseline*:  $11 \pm 4/GF$ ).



**Abb. 21:** Quantitative Analyse von CAE-positiven (CAE+) Zellen der Leber [A] sowie Lunge [B] in der WT-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu unbehandelten WT-Versuchstieren (*Baseline*). Angabe aller Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, # $p < 0,05$ .

**Koagulation:** Die Anzahl der Thrombozyten nahm nach 8,5 Stunden GSR um ca. 61% im Vergleich zu dem *Baseline*-Wert ab (siehe Abb. 22 A; 8,5h:  $361 \pm 62 \cdot 10^9/l$  # vs. *Baseline*:  $938 \pm 55 \cdot 10^9/l$ ). Ergänzend sei auch die signifikante Abnahme der Erythrozyten auf 89% durch die GSR erwähnt (siehe Abb. 22 B; 8,5h:  $8 \pm 0 \cdot 10^{12}/l$  # vs. *Baseline*:  $9 \pm 0 \cdot 10^{12}/l$ ).



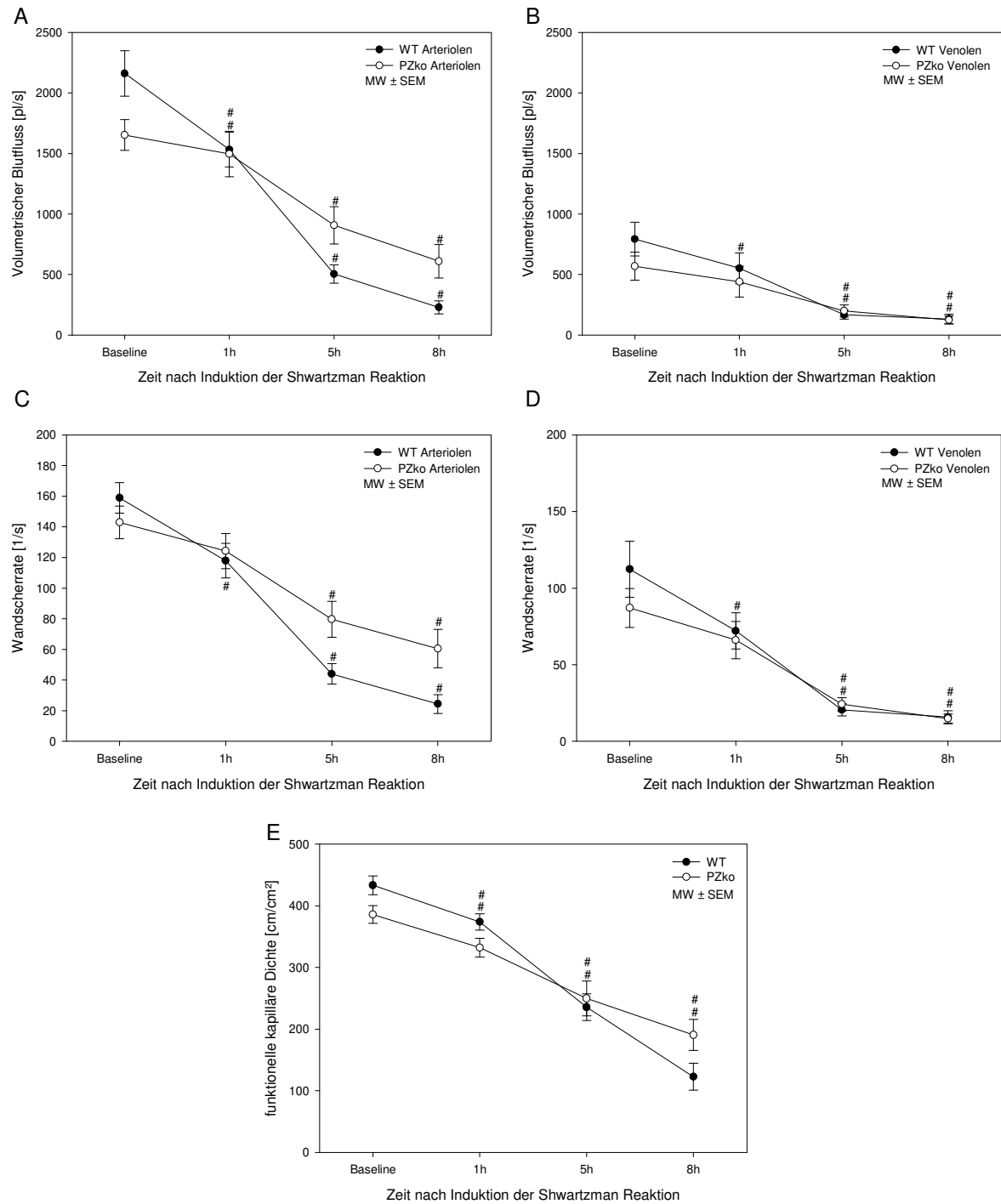
**Abb. 22:** Quantitative Analyse von Thrombozyten [A] sowie Erythrozyten [B] in der WT-Gruppe, vor (*Baseline*) sowie 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, # $p < 0,05$ .

### 3.2. Eigenschaften der Protein Z-Defizienz (PZko) während einer GSR

Um den PZko zu charakterisieren, wurden die einzelnen Parameter verglichen zu den entsprechenden Werten der WT-Tiere. Weiterhin erfolgte auch innerhalb der PZko-Gruppe eine Analyse der Verlaufswerte gegenüber den *Baseline*-Messungen.

**Mikrohämodynamik:** Hinsichtlich des VBF, der WSR sowie der FCD wies der PZko zu den unterschiedlichen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zu den Werten der WT-Gruppe auf. Innerhalb der PZko-Gruppe war, ähnlich der WT-Gruppe, in allen 3 Parametern ein signifikanter Abfall während der GSR zu verzeichnen. Lediglich zur 1. Stunde der GSR konnte keine signifikante Abnahme in dem VBF der Venolen sowie in der WSR der Arteriolen und Venolen gemessen werden (siehe Abb. 23 und Tabelle 8).



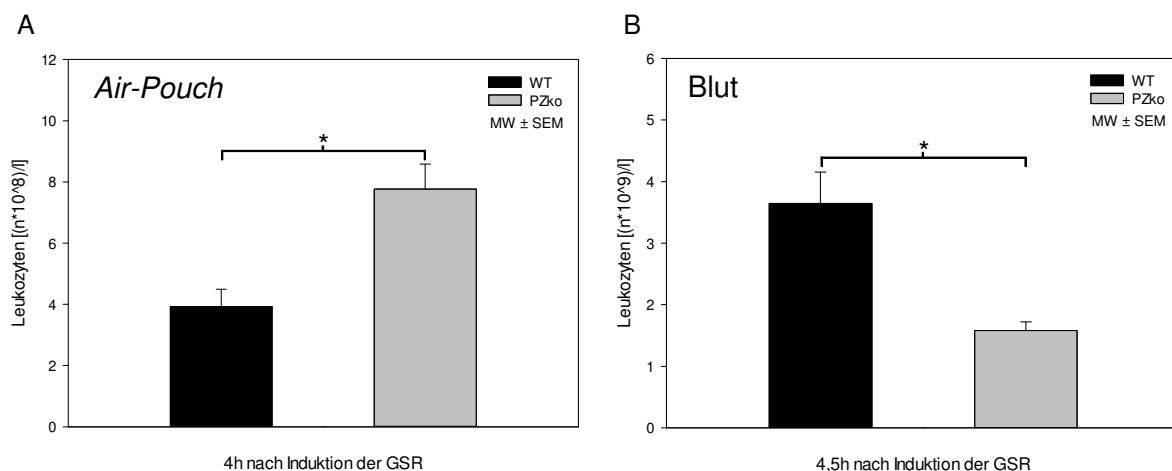


**Abb. 23:** Quantitative Analyse des volumetrischen Blutflusses [A, B] und der Wandscherrate [C, D] in Arteriolen [A, C] und Venolen [B, D] sowie der funktionellen kapillären Dichte [E] der WT- und PZko-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*

PZko	Baseline	1h	5h	8h
<b>Volumetrischer Blutfluss [pl/s]</b>				
<b>Arteriolen</b>	1653 ± 127	1496 ± 188 #	907 ± 154 #	610 ± 138 #
<b>Venolen</b>	569 ± 115	441 ± 126	200 ± 50 #	125 ± 33 #
<b>Wandscherrate [1/s]</b>				
<b>Arteriolen</b>	143 ± 11	124 ± 11	80 ± 12 #	61 ± 13 #
<b>Venolen</b>	87 ± 13	66 ± 12	24 ± 4 #	15 ± 3 #
<b>funktionelle kapilläre Dichte [cm/cm²]</b>				
	386 ± 14	332 ± 15 #	250 ± 28 #	191 ± 25 #

**Tabelle 8:** Tabellarische Übersicht über die im *CAPIMAGE* zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Mittelwerte in der PZko-Gruppe hinsichtlich des volumetrischen Blutflusses und der Wandscherrate in Arteriolen und Venolen sowie der funktionellen kapillären Dichte. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*

**Inflammation:** Die nach 4 Stunden GSR erfolgte Aspiration des *Air-Pouch*-Exsudates ergab eine 2-fach höhere Anzahl von Leukozyten im PZko vs. der WT-Versuchstiere (siehe Abb. 24 A; Leukozyten im *Air-Pouch*, 4h:  $8 \pm 1 \cdot 10^8/l$  \* vs. WT 4h:  $4 \pm 1 \cdot 10^8/l$ ). In Konkordanz zu dieser aggravierten Extravasation in den PZ-defizienten Tieren konnte nach 4,5 Stunden GSR im *Air-Pouch* Modell eine signifikant um 56% verminderte systemische Leukozyten-Anzahl im PZko vs. der WT-Gruppe bestimmt werden (siehe Abb. 24 B und Tabelle 9).

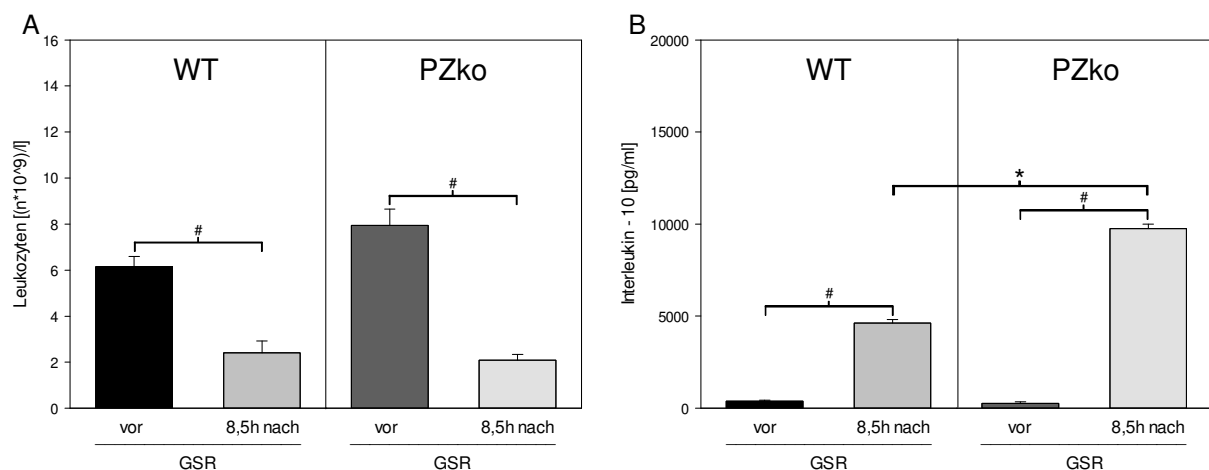


**Abb. 24:** Quantitative Analyse von Leukozyten im *Air-Pouch* [A] nach 4 Stunden GSR sowie der Leukozyten im Blutbild [B] nach 4,5 Stunden GSR in der WT- und PZko-Gruppe. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, \* $p<0,05$  vs. WT.

nach 4,5h GSR	Leuk [(n*10 <sup>9</sup> )/l]	Neut + Mono [(n*10 <sup>9</sup> )/l]	Lym [(n*10 <sup>9</sup> )/l]
WT	3,6 ± 0,5	1,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3
PZko	1,6 ± 0,1 *	0,4 ± 0,1 *	1,2 ± 0,1 *

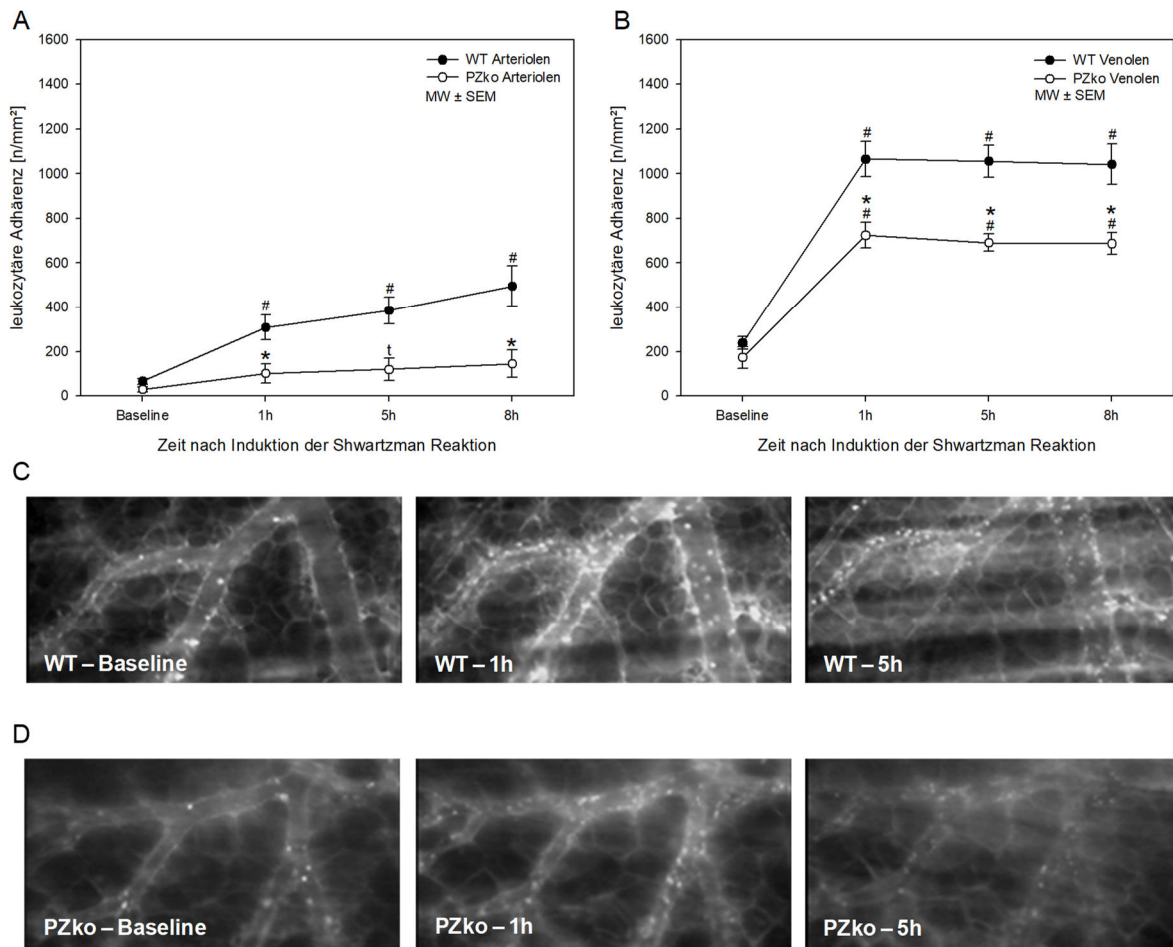
**Tabelle 9:** Tabellarische Übersicht über die Anzahl der gemessenen Leukozyten (Leuk), Neutrophilen und Monozyten (Neut + Mono) sowie der Lymphozyten (Lym) im Blut nach 4,5 Stunden GSR im *Air-Pouch* Modell. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, \*p<0,05 vs. WT.

Ähnlich der WT-Versuchstiere zeigte sich in der PZko-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR ein signifikanter Abfall der systemischen Leukozyten auf 25% des Baseline-Wertes sowie ein Anstieg der IL-10 Werte um das 38-Fache. Ein Vergleich dieser Parameter zwischen beiden Gruppen ergab signifikant erhöhte IL-10 Werte um das 2-Fache bei den PZko-Versuchstieren (siehe Abb. 25; systemische Leukozyten, 8,5h:  $2 \pm 0,1 \cdot 10^9/l$  # vs. *Baseline*:  $8 \pm 1 \cdot 10^9/l$ ; IL-10, 8,5h:  $9753 \pm 248 \text{ pg/ml}$  # \* vs. *Baseline*:  $258 \pm 82 \text{ pg/ml}$  und vs. WT 8,5h:  $4620 \pm 197 \text{ pg/ml}$ ).



**Abb. 25:** Quantitative Analyse von systemischen Leukozyten [A] sowie Interleukin-10 [B] in der WT- und PZko-Gruppe, vor (*Baseline*) sowie 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, #p<0,0125 vs. *Baseline*; \*p<0,0125 vs. WT.

Bei annähernd gleichen *Baseline*-Werten ergab die Auszählung der leukozytären Adhärenz für den PZko im Vergleich zu der WT-Gruppe eine signifikante Verminderung über die 8 Stunden GSR hinweg, sowohl in den Arteriolen wie auch den Venolen. Eine Ausnahme bildeten die Arteriolen des PZko zur 5. Stunde GSR mit einem P-Wert von 0,018. Verglichen zu den *Baseline*-Werten der PZko-Gruppe zeigte sich im Verlauf der GSR nur bei den Venolen ein signifikanter Anstieg der adhärenenten Leukozyten (siehe Abb. 26 und Tabelle 10). Für die *Leakage* konnte weder ein Unterschied zu den WT-Versuchstieren noch ein signifikanter Anstieg oder Abfall im GSR-Verlauf der PZko-Gruppe gemessen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

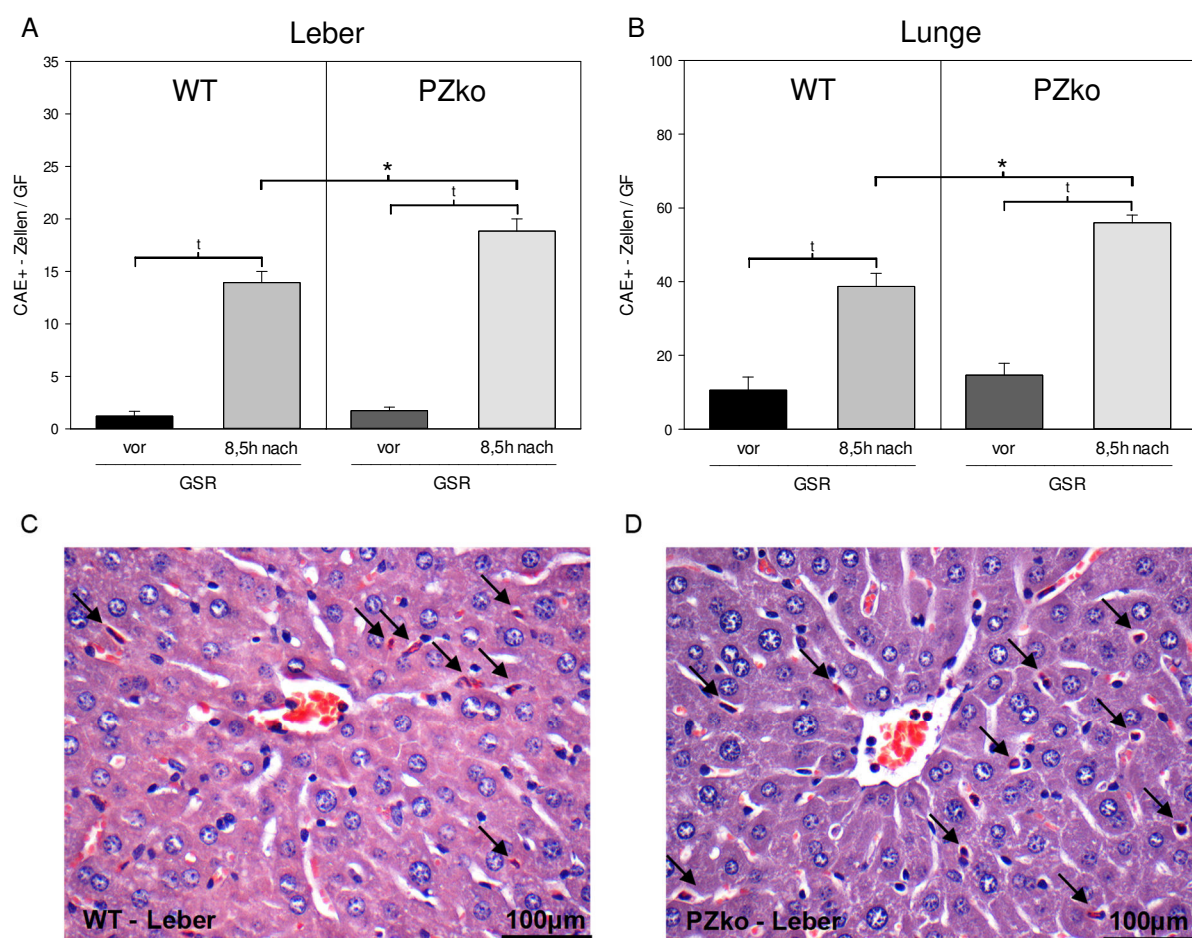


**Abb. 26:** Repräsentative, intravitalmikroskopische Bilder ([C] WT; [D] PZko) und quantitative Analyse der leukozytären Adhärenz in Arteriolen [A] sowie Venolen [B] der WT- und PZko-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc:* Student-Newman-Keuls-Test, # $p < 0,05$  vs. *Baseline*. Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, \* $p < 0,0125$  vs. WT, t für Trend mit  $p < 0,02$ .

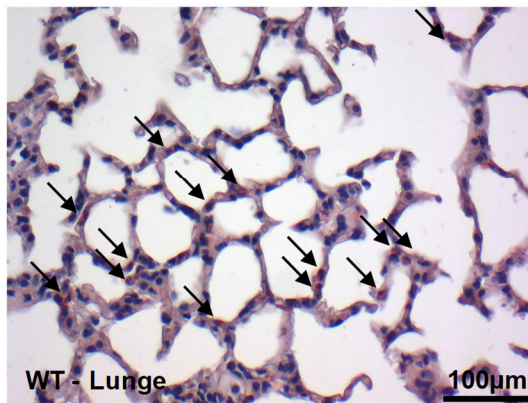
WT	<i>Baseline</i>	1h	5h	8h
leukozytäre Adhärenz [n/mm <sup>2</sup> ]				
Arteriolen	66 ± 13	308 ± 56 #	386 ± 60 #	496 ± 91 #
Venolen	238 ± 29	1066 ± 80 #	1056 ± 73 #	1043 ± 90 #
PZko	<i>Baseline</i>	1h	5h	8h
leukozytäre Adhärenz [n/mm <sup>2</sup> ]				
Arteriolen	29 ± 11	101 ± 42 *	119 ± 51 t	145 ± 62 *
Venolen	173 ± 48	725 ± 59 # *	691 ± 38 # *	688 ± 49 # *

**Tabelle 10:** Tabellarische Übersicht über die im *CAPIMAGE* zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Mittelwerte in der PZko-Gruppe hinsichtlich der leukozytären Adhärenz in Arteriolen und Venolen. Zum Vergleich wurden die Werte der WT-Gruppe gegenübergestellt. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc:* Student-Newman-Keuls-Test, # $p < 0,05$  vs. *Baseline*. Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, \* $p < 0,0125$  vs. WT, t für Trend mit  $p < 0,02$

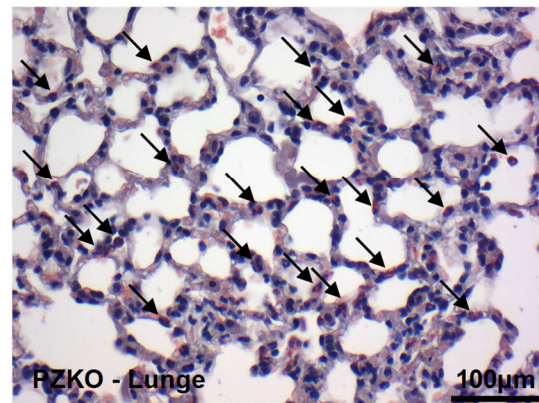
Die erhöhte leukozytäre Extravasation im *Air-Pouch*-Modell konnte auch nach 8,5 Stunden GSR im Rückenhautkammer-Modell durch die Auszählung CAE-positiver Zellen in der Lunge und Leber bestätigt werden. Im PZko wurden dementsprechend in der Leber ca. 36% und in der Lunge ca. 44% mehr CAE-positive Zellen, bezogen auf die entsprechenden Gewebe der WT-Tiere, ausgezählt (siehe Abb. 27; Leber, 8,5h:  $19 \pm 1/\text{GF}^*$  vs. WT 8,5h:  $14 \pm 1/\text{GF}$ ; Lunge, 8,5h:  $56 \pm 2/\text{GF}^*$  vs. WT 8,5h:  $39 \pm 4/\text{GF}$ ). Beim Vergleich der 8,5 Stunden Daten mit den *Baseline*-Ergebnissen der unbehandelten PZko-Versuchstiere konnte wie bei der WT Gruppe ein Anstieg der CAE-positiven Zellen in beiden Auszählungen beobachtet werden (siehe Abb. 27; Leber, 8,5h:  $19 \pm 1/\text{GF}^\dagger$  vs. *Baseline*:  $2 \pm 0/\text{GF}$ ; Lunge, 8,5h:  $56 \pm 2/\text{GF}^\dagger$  vs. *Baseline*:  $15 \pm 3$ ).



E

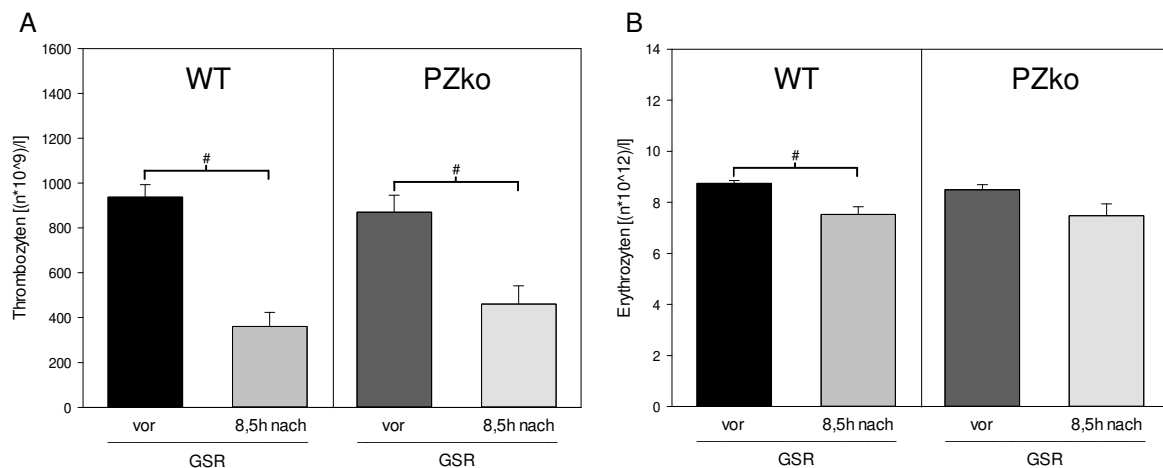


F

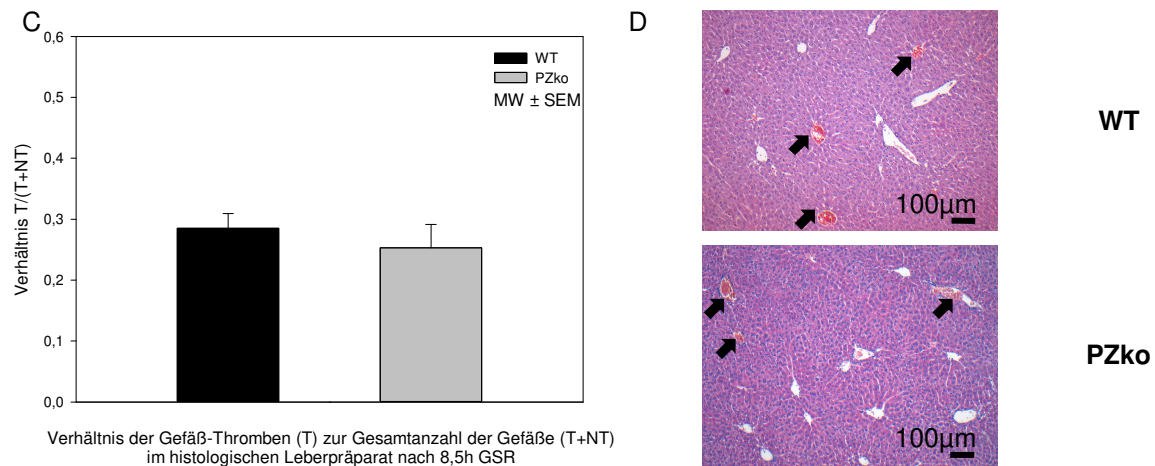


**Abb. 27:** Quantitative Analyse von CAE-positiven (CAE+) Zellen in Leber [A] sowie Lunge [B] der WT- und PZko-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Versuchstieren (*Baseline*). Repräsentative, histologische Bilder nach 8,5 Stunden GSR ([C, D] Leber; [E, F] Lunge) in 40-Facher Vergrößerung. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, # $p < 0,0125$  vs. *Baseline*, t für Trend mit  $p < 0,02$ ; \* $p < 0,0125$  vs. WT.

**Koagulation:** In der PZko-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Verbrauch von Thrombozyten nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu den *Baseline*-Werten (8,5h:  $461 \pm 82 \cdot 10^9/l$  # vs. *Baseline*:  $870 \pm 77 \cdot 10^9/l$ ). Zwischen der PZko- und der WT-Gruppe wurden zu keinem Zeitpunkt Unterschiede hinsichtlich der Thrombozyten- oder Erythrozyten-Anzahl festgestellt. Auch die Auszählung der Gefäßthromben in den Leberschnitten nach 8,5h GSR ergab keine Signifikanzen (siehe Abb. 28).





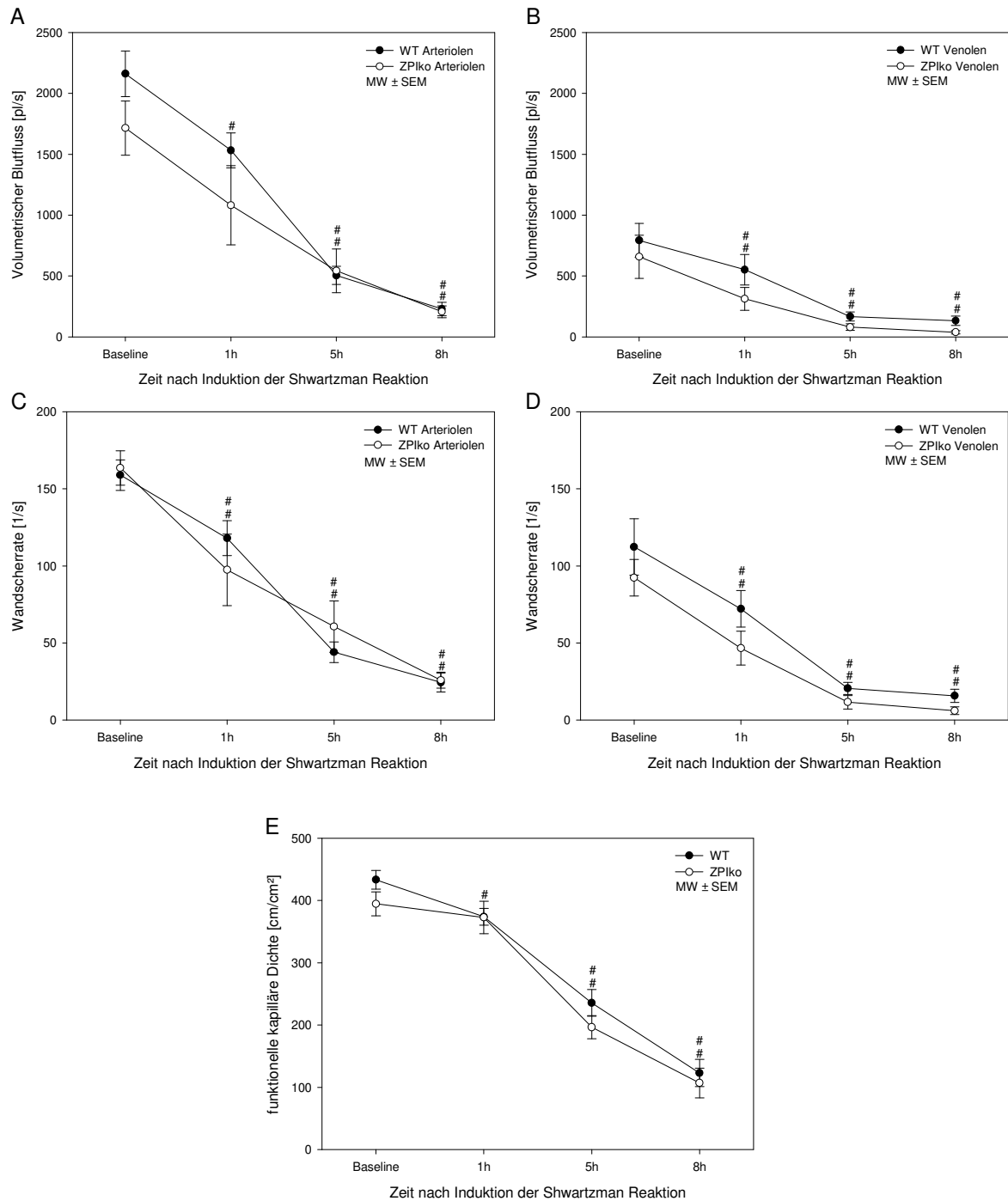


**Abb. 28:** Quantitative Analyse von Thrombozyten [A] sowie Erythrozyten [B] in der WT- und PZko-Gruppe, vor (*Baseline*) sowie 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur,  $\#p < 0,0125$  vs. *Baseline*. Quantitative Analyse [C] und repräsentative, histologische Abbildungen [D] der Gefäßthromben in den Leberschnitten der WT- und der PZko-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test. Anzahl der Gefäß-Thromben (T), Anzahl der nicht Gefäß-Thromben (NT).

### 3.3. Eigenschaften der Protein Z abhängigen Protease Inhibitor-Defizienz (ZPIko) während einer GSR

Die Charakterisierung des ZPIko erfolgte, wie die des PZko, durch einen Vergleich der erhobenen Parameter zu denen der WT-Versuchstiere. Ebenfalls wurden zusätzlich alle Werte innerhalb der ZPIko-Gruppe gegenüber den *Baseline*-Messungen verglichen, um den Verlauf beurteilen zu können.

**Mikrohämodynamik:** In der Verlaufsbeurteilung des ZPIko ergab sich in fast allen gemessenen Werten des VBF, der WSR sowie der FCD ein signifikanter Abfall über die 8 Stunden GSR hinweg. Lediglich zur 1. Stunde konnten keine signifikanten Unterschiede in dem VBF der Arteriolen sowie in der FCD gemessen werden (siehe Abb. 29 und Tabelle 11). Ein Vergleich dieser hämodynamischen Parameter des ZPIko mit den entsprechenden Werten der WT-Versuchstiere ergab keine Unterschiede.



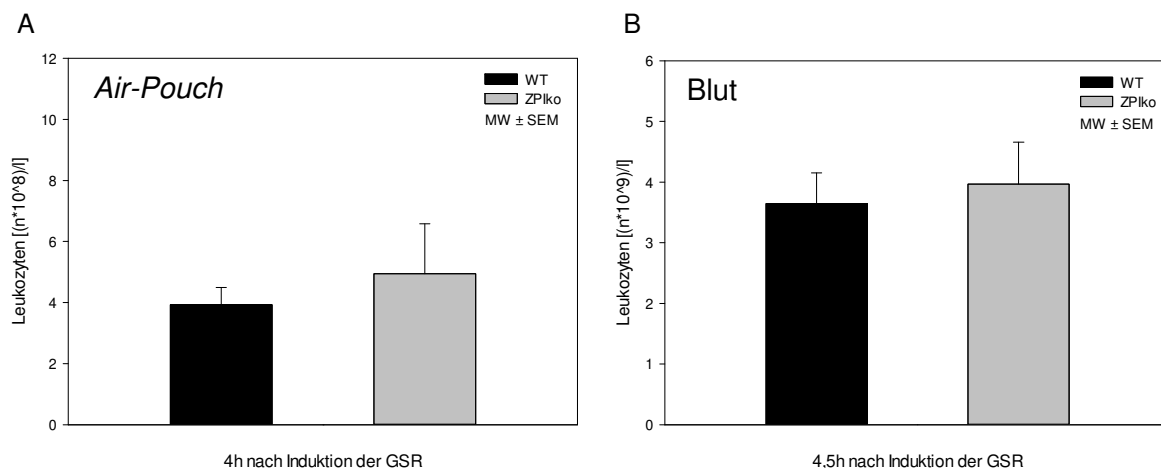
**Abb. 29:** Quantitative Analyse des volumetrischen Blutflusses [A, B] und der Wandscherrate [C, D] in Arteriolen [A, C] und Venolen [B, D] sowie der funktionellen kapillären Dichte [E] der WT- und ZPlko-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. Baseline.*



ZPIko	Baseline	1h	5h	8h
Volumetrischer Blutfluss [pl/s]				
Arteriolen	1715 ± 222	1080 ± 325	543 ± 180 #	207 ± 49 #
Venolen	658 ± 178	312 ± 94 #	80 ± 27 #	38 ± 14 #
Wandscherrate [1/s]				
Arteriolen	164 ± 11	97 ± 23 #	61 ± 17 #	26 ± 5 #
Venolen	92 ± 12	47 ± 11 #	12 ± 4 #	6 ± 2 #
funktionelle kapilläre Dichte [cm/cm²]				
	395 ± 19	373 ± 26	197 ± 19 #	107 ± 24 #

**Tabelle 11:** Tabellarische Übersicht über die im *CAPIMAGE* zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Mittelwerte in der ZPIko-Gruppe hinsichtlich des volumetrischen Blutflusses und der Wandscherrate in Arteriolen und Venolen sowie der funktionellen kapillären Dichte. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks*, *post-hoc*: Student-Newman-Keuls-Test, #p<0,05 vs. *Baseline*.

**Inflammation:** Im Leukozyten-Exsudat des *Air-Pouch*-Modells sowie in der Analyse der systemischen Leukozyten nach 4,5h GSR konnten keine Unterschiede zwischen den ZPIko- und WT-Versuchstieren gefunden werden (siehe Abb. 30).



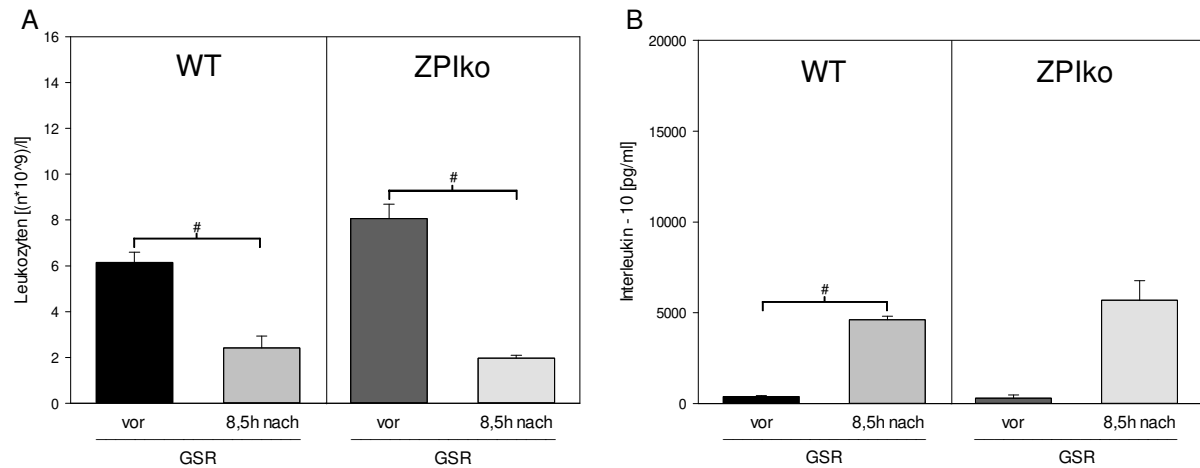
**Abb. 30:** Quantitative Analyse von Leukozyten im *Air-Pouch* [A] nach 4 Stunden GSR sowie der Leukozyten im Blutbild [B] nach 4,5 Stunden GSR in der WT- und ZPIko-Gruppe. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

nach 4,5h GSR	Leuk [(n*10 <sup>9</sup> )/l]	Neut + Mono [(n*10 <sup>9</sup> )/l]	Lym [(n*10 <sup>9</sup> )/l]
WT	3,6 ± 0,5	1,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3
ZPIko	4,0 ± 0,7	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,5

**Tabelle 12:** Tabellarische Übersicht über die Anzahl der gemessenen Leukozyten (Leuk), Neutrophilen und Monozyten (Neut + Mono) sowie der Lymphozyten (Lym) im Blut nach 4,5 Stunden GSR im *Air-Pouch* Modell. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

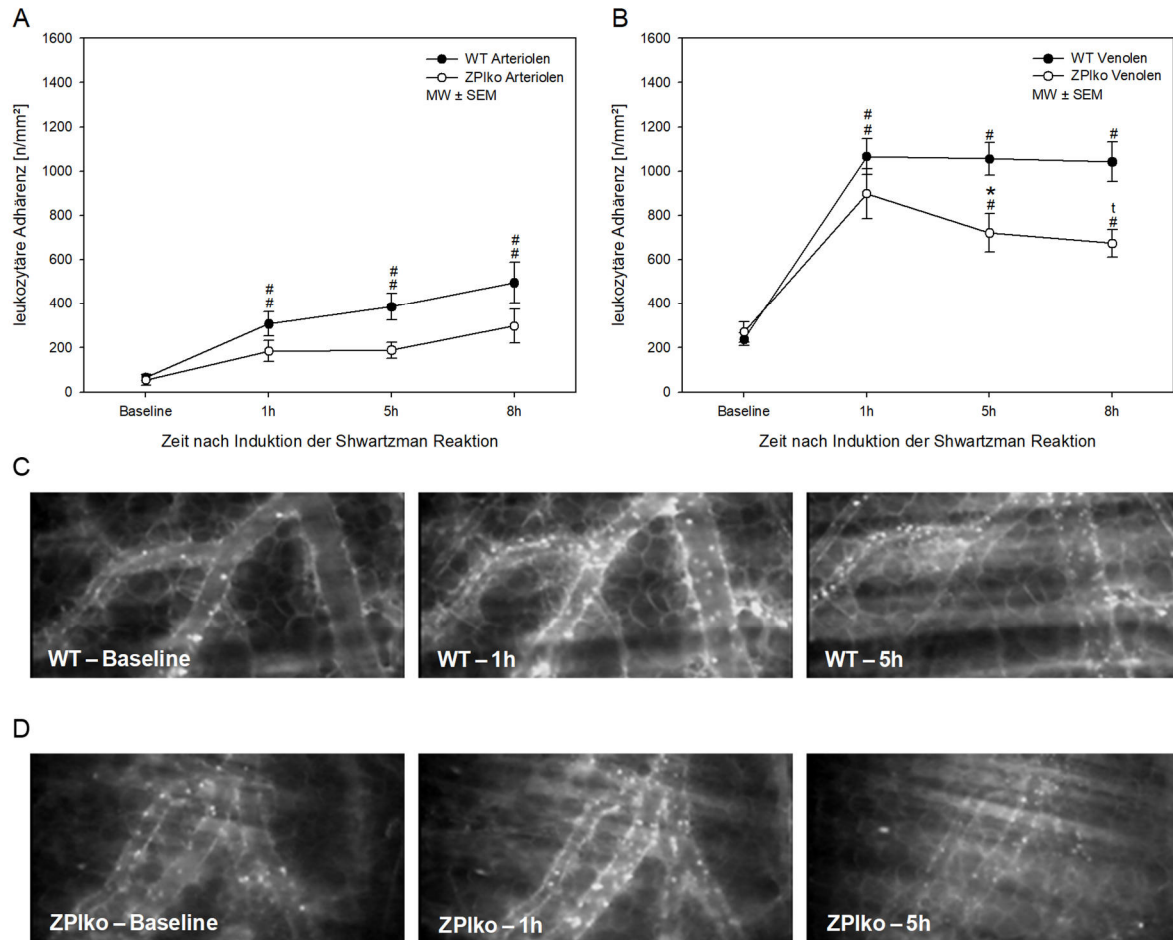
In der Blutanalyse nach 8,5 Stunden GSR konnte für den ZPIko ein Abfall der systemischen Leukozyten auf 25% sowie mit einem P-Wert von 0,029 ein - aufgrund der Bonferroni-

Korrektur - nicht signifikanter Anstieg in den IL-10 Werten um das 19-Fache beobachtet werden (siehe Abb. 31; Leukozyten, 8,5h:  $2 \pm 0 \cdot 10^9/l$  # vs. *Baseline*:  $8 \pm 1 \cdot 10^9/l$ ; IL-10, 8,5h:  $5688 \pm 1071 \text{ pg/ml}$  vs. *Baseline*:  $295 \pm 188 \text{ pg/ml}$ ). Weiterhin konnten für diese Parameter zwischen der ZPIko- und WT-Gruppe keine Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 31:** Quantitative Analyse von systemischen Leukozyten [A] sowie Interleukin-10 [B] in der WT und ZPIko-Gruppe, vor (*Baseline*) sowie 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, # $p < 0,0125$  vs. *Baseline*; \* $p < 0,0125$  vs. WT.

Im Gegensatz zu dem PZko zeigte sich in dem ZPIko keine generalisierte verminderte leukozytäre Adhärenz im Vergleich zu den WT-Tieren. Nur in den Venolen zur 5. und 8. Stunde der GSR konnte ein Unterschied festgestellt werden. Im GSR-Verlauf der ZPIko-Gruppe konnten bereits ab der 1. Stunde sowohl in den Arteriolen als auch in den Venolen eine signifikant höhere Leukozyten-Adhärenz gemessen werden, verglichen zu den *Baseline*-Werten (siehe Abb. 32 und Tabelle 13). Hinsichtlich der *Leakage* zeigten sich weder im Verlauf noch im Vergleich zu den WT-Versuchstieren Unterschiede (Ergebnisse nicht dargestellt).



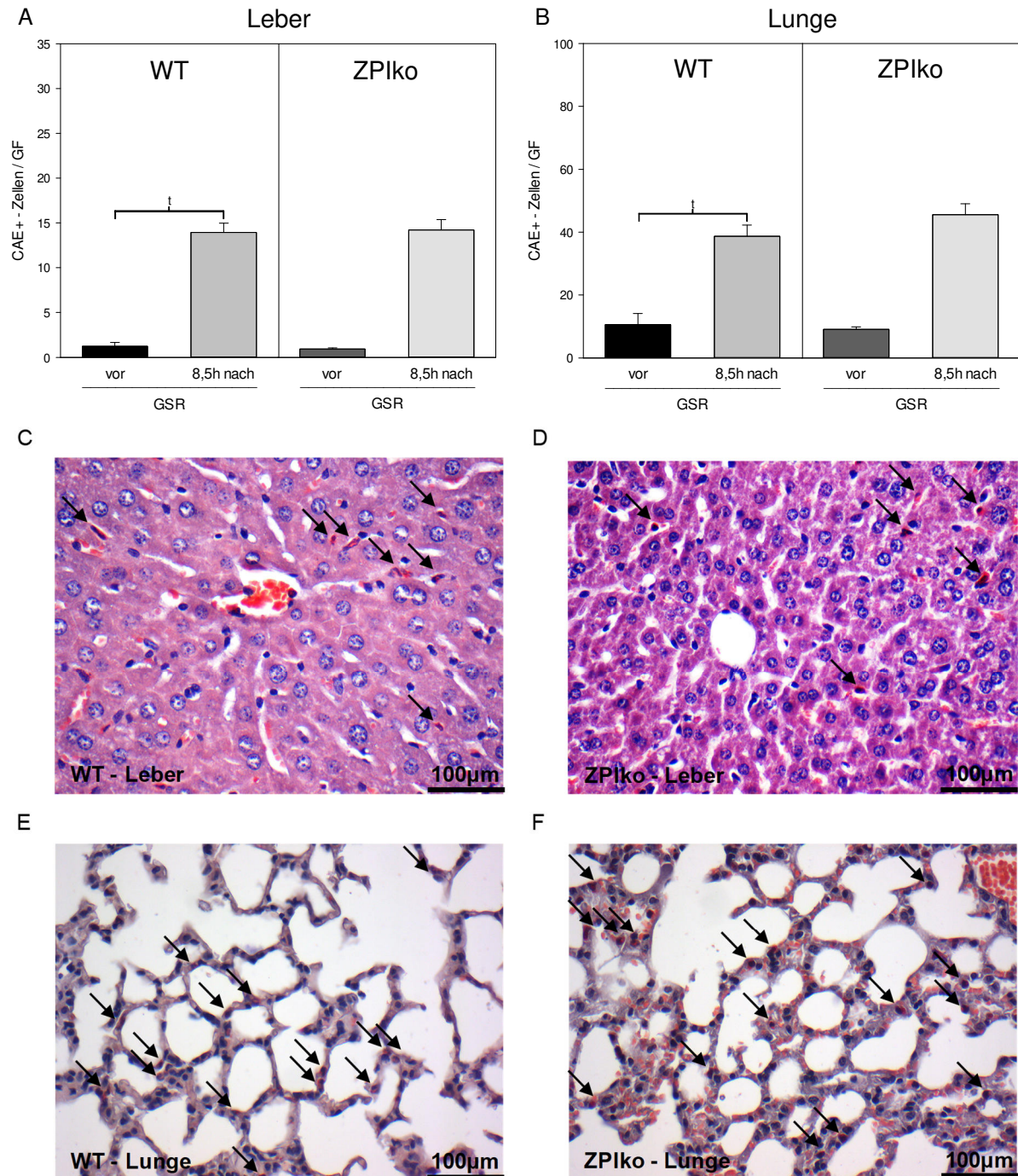
**Abb. 32:** Repräsentative, intravitalmikroskopische Bilder ([C] WT; [D] ZPIko) und quantitative Analyse der leukozytären Adhärenz in Arteriolen [A] sowie Venolen [B] der WT- und ZPIko-Gruppe, 24 Stunden vor (*Baseline*) sowie 1, 5 und 8 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc:* Student-Newman-Keuls-Test, # $p < 0,05$  vs. *Baseline*. Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferoni-Korrektur, \* $p < 0,0125$  vs. WT, t für Trend mit  $p < 0,02$ .

WT	<i>Baseline</i>	1h	5h	8h
leukozytäre Adhärenz [n/mm <sup>2</sup> ]				
Arteriolen	66 $\pm$ 13	308 $\pm$ 56 #	386 $\pm$ 60 #	496 $\pm$ 91 #
Venolen	238 $\pm$ 29	1066 $\pm$ 80 #	1056 $\pm$ 73 #	1043 $\pm$ 90
ZPIko	<i>Baseline</i>	1h	5h	8h
leukozytäre Adhärenz [n/mm <sup>2</sup> ]				
Arteriolen	54 $\pm$ 24	185 $\pm$ 47 #	189 $\pm$ 36 #	298 $\pm$ 77 #
Venolen	271 $\pm$ 47	899 $\pm$ 112 #	722 $\pm$ 87 # *	674 $\pm$ 62 # t

**Tabelle 13:** Tabellarische Übersicht über die im *CAPIMAGE* zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhobenen Mittelwerte in der ZPIko-Gruppe hinsichtlich der leukozytären Adhärenz in Arteriolen und Venolen. Zum Vergleich wurden die Werte der WT-Gruppe gegenübergestellt. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). *Repeated measures ANOVA on ranks, post-hoc:* Student-Newman-Keuls-Test, # $p < 0,05$  vs. *Baseline*. Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferoni-Korrektur, \* $p < 0,0125$  vs. WT, t für Trend mit  $p < 0,02$ .

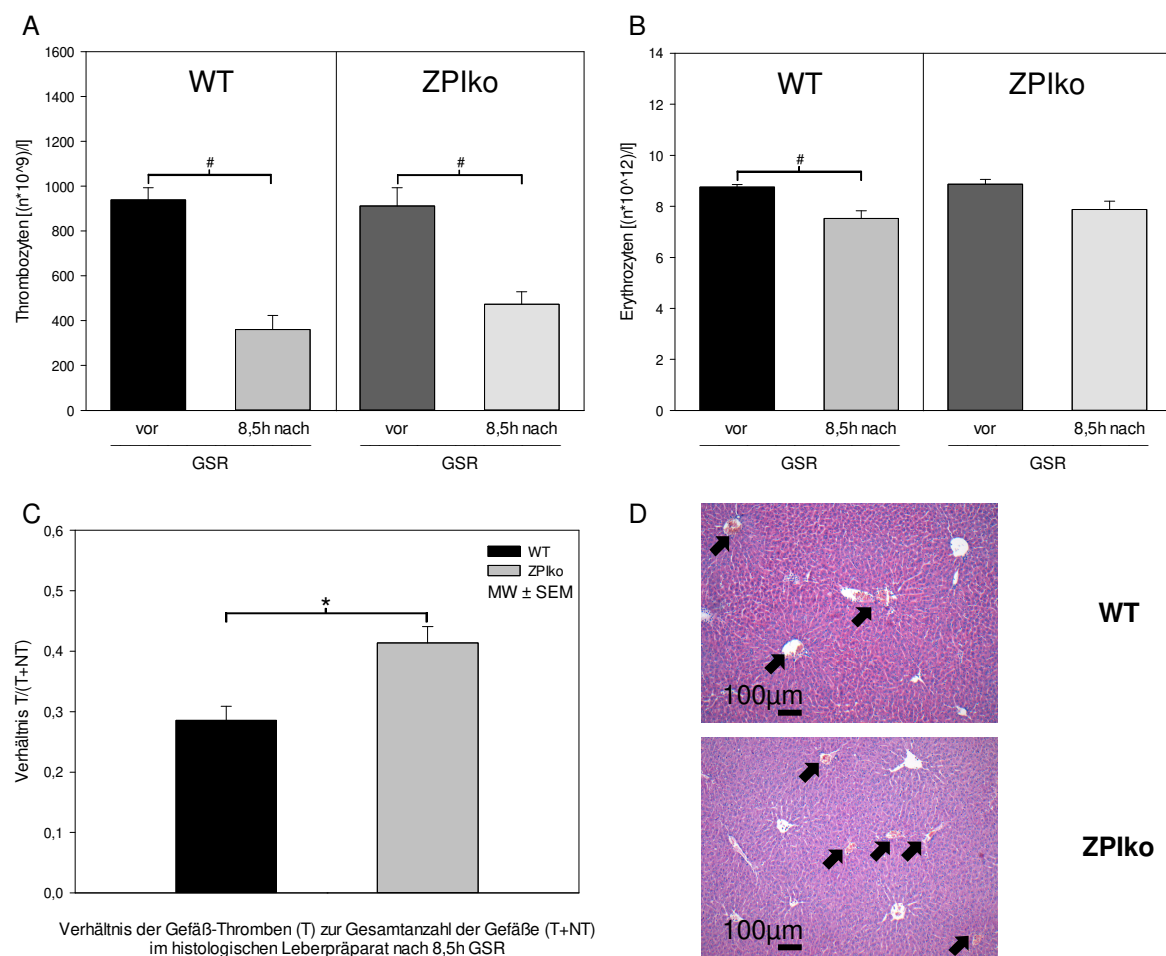
Passend zu den *Air-Pouch*-Ergebnissen konnte auch im Rückenhautkammer-Modell keine erhöhte oder verminderte Extravasation von Leukozyten in der Leber und Lunge nach 8,5h

GSR vs. der WT-Versuchstiere beobachtet werden (siehe Abb. 33). Innerhalb der ZPIko-Gruppe konnte ein Anstieg der CAE-positiven Zellen in der Leber ( $P=0,024$ ) und Lunge ( $P=0,024$ ) im Vergleich zu den *Baseline*-Versuchstieren analysiert werden. Aufgrund der Bonferroni-Korrektur sind diese Veränderungen jedoch nicht signifikant ( $\#p<0,0125$ ).



**Abb. 33:** Quantitative Analyse von CAE-positiven (CAE+) Zellen in Leber [A] sowie Lunge [B] der WT- und ZPIko-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Versuchstieren (*Baseline*). Repräsentative, histologische Bilder nach 8,5 Stunden GSR ([C, D] Leber; [E, F] Lunge) in 40-Facher Vergrößerung. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur,  $\#p<0,0125$  vs. *Baseline*,  $t$  für Trend mit  $p<0,02$ .

**Koagulation:** Im Verlauf der GSR konnte innerhalb der ZPIko-Gruppe eine signifikante Abnahme der Thrombozyten-Anzahl nach 8,5 Stunden gemessen werden (siehe Abb. 34 A; 8,5h:  $473 \pm 57 \cdot 10^9/l$  # vs. *Baseline*:  $911 \pm 82 \cdot 10^9/l$ ). Verglichen zu den Werten der WT-Versuchstiere wurden für die Thrombozyten- und Erythrozyten-Messungen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede beobachtet (siehe Abb. 34 A-B). Mit einem P-Wert von 0,065 war die Erythrozytopenie des ZPIko nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu den Baseline-Werten nicht signifikant (siehe Abb. 34 B). In den histologischen Leberschnitten des ZPIko konnten jedoch rund 8% mehr Gefäßthromben ausgezählt werden als in den WT-Versuchstieren (siehe Abb. 34 C-D; 8,5h:  $0,41 \pm 0,03$  \* vs. WT 8,5:  $0,38 \pm 0,03$ ).



**Abb. 34:** Quantitative Analyse von Thrombozyten [A] sowie Erythrozyten [B] in der WT- und ZPIko-Gruppe, vor (*Baseline*) sowie 8,5 Stunden nach Induktion einer GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test mit Bonferroni-Korrektur, # $p < 0,0125$  vs. *Baseline*. Quantitative Analyse [C] und repräsentative, histologische Abbildungen [D] der Gefäßthromben in den Leberschnitten der WT- und der ZPIko-Gruppe nach 8,5 Stunden GSR. Angabe aller Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mann-Whitney *Rank Sum* Test, \* $p < 0,05$  vs. WT. Anzahl der Gefäß-Thromben (T), Anzahl der nicht Gefäß-Thromben (NT).

### 3.4. Zusammenfassung

Die Charakterisierung der GSR ergab eine signifikante Verschlechterung hämodynamischer Parameter (VBF, WSR, FCD) über die 8 Stunden hinweg. Hinsichtlich der Inflammation wurden eine Erhöhung der leukozytären Adhärenz im GSR-Verlauf, sowie eine Leukozytopenie, erhöhte IL-10-Werte und ein Anstieg CAE-positiver Zellen in Leber und Lunge nach 8,5 Stunden GSR beobachtet. Weiterhin ergaben die Blutuntersuchungen eine durch die GSR bedingte Thrombozyto- und Erythrozytopenie.

Im Vergleich zu den WT-Versuchstieren wurden keine mikrohämodynamischen Unterschiede im PZko festgestellt. Es konnten jedoch eine verstärkte Leukozyten-Extravasation in den *Air-Pouch* nach 4 Stunden bzw. in die Leber und Lunge nach 8,5 Stunden GSR mit einer resultierenden aggravierten Leukozytopenie nach 4,5 Stunden sowie einer reduzierten leukozytären Adhärenz im GSR-Verlauf analysiert werden. Des Weiteren ergaben sich erhöhte IL-10-Werte nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu den WT-Tieren. Hinsichtlich der Gefäßthromben, Thrombozyten- und Erythrozytenanzahl gab es keine Unterschiede zu der WT-Gruppe. Auch der ZPIko zeigte keine Veränderungen in der Mikrohämodynamik, verglichen zu den WT-Tieren. Ebenfalls konnten kaum Unterschiede in den gemessenen inflammatorischen Parametern festgestellt werden. Es stellte sich eine signifikant erhöhte Anzahl thrombosierter Leber-Gefäße nach 8,5 Stunden GSR im Vergleich zu der WT-Gruppe dar.



## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion von Material und Methoden

In der vorliegenden Studie erfolgte die Charakterisierung einer PZ- und ZPI-Defizienz der Maus während einer **generalisierten Shwartzman Reaktion** als **Modell einer Sepsis**. Für die Untersuchung mikrohämodynamischer Parameter sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen wurde die **Intravitalmikroskopie** an der **dorsalen Rückenhautkammer** angewandt. Ergänzend erfolgte die quantitative Analyse der Leukozyten-Extravasation in einen **Air-Pouch** sowie in das Lungen- und Leber-Gewebe. Darüber hinaus erfolgten laborchemische Untersuchungen hinsichtlich der Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozyten-Anzahl sowie die **Bestimmung des Interleukins-10**.

#### 4.1.1. Modelle der Sepsis

Entgegen der zunehmenden pathophysiologischen Erkenntnisse sowie neueren, internationalen Therapiestrategien {Levy et al. 2018} stellt die Sepsis bis heute weiterhin ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit hoher Letalität dar {Bracht et al. 2019}. In der Grundlagenforschung zur Pathophysiologie der Sepsis sowie der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten spielt das Maus-Modell bis heute eine wichtige präklinische Rolle {Stortz et al. 2017, Rittirsch et al. 2007, Menger et al. 1999}.

Zum heutigen Zeitpunkt existieren mehrere etablierte Sepsis-Modelle der Maus mit jeweiligen Vor- und Nachteilen {Stortz et al. 2017}. Gemein ist allen Modellen, dass nur eine eingeschränkte Anwendung der Ergebnisse auf das humane, septische Krankheitsbild möglich ist {Rittirsch et al. 2007}. Dieser Umstand resultiert u.a. aus der Komplexität der pathophysiologischen Vorgänge einer Sepsis, den unterschiedlichen Bedingungen sowie aus den allgemeinen Unterschieden der Spezies. So werden für die Experimente z.B. überwiegend „junge“, männliche Mäuse ohne „Begleiterkrankungen“ genutzt und in oft keimarmen Umgebungen gehalten, um standardisierte Bedingungen zu schaffen {Rittirsch et al. 2007}. Darüber hinaus stellen sich Unterschiede z.B. in dem Aufbau des *Toll-like receptor* sowie in dem Verlauf des inflammatorischen Zytokin-Profiles zwischen Maus und Mensch dar {Rittirsch et al. 2017}. So konnte der Einsatz eines, im Tiermodell erfolgreich erprobten Antikörpers gegen den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  in der klinischen Erprobung keinen Überlebensvorteil zeigen {Fischer et al. 1996}. Demgegenüber führte die klinische Anwendung von rekombinanten, aktivierten Protein C (rhAPC) bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock zu einer verbesserten Mikrozirkulation {Donati et al. 2013}, obgleich eine mögliche positive Beeinflussung der Patienten-Mortalität kontrovers diskutiert wird {Kumar 2019, Ranieri et al. 2012, Bernard et al. 2001}. Trotz der Limitationen sind die Tiermodelle und Versuche unabdingbar

für ein besseres Verständnis molekularer und genetischer Mechanismen während einer Sepsis {Stortz et al. 2017, Rittirsch et al. 2007}.

Zu den etablierten Maus-Modellen einer Sepsis zählen die intravenöse Applikation von Endotoxinen (z.B. LPS) oder pathogenen Organismen, die Kolon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP für *Colon ascendens stent peritonitis*) oder die Ligatur und Punktion des Zökums (CLP für *cecal ligation and puncture*) {Stortz et al. 2017, Rittirsch et al. 2007}. Sowohl dem CLP- als auch dem CASP-Modell liegt eine operative Unterbrechung der Darm-Bauchraum-Barriere zugrunde, sodass sich Darminhalt mit begleitenden Mikroorganismen (Bakterien) in die Bauchhöhle entleert und eine polymikrobielle Peritonitis entwickelt {Stortz et al. 2017}. Obwohl diese Modelle den spontanen Verlauf einer Sepsis sehr ähneln, ergeben sich jedoch die Nachteile in der erschwerten Standardisierung und damit bedingten Ausprägung des septischen Krankheitsbildes. So wird beispielsweise die Schwere der Sepsis sowie die Mortalität durch die Nadelgröße der Punktion sowie durch die Strecke der Zökumligatur beeinflusst {Stortz et al. 2017}. Dem gegenüber besteht der Vorteil der intravenösen Applikation eines Endotoxins in der technischen Einfachheit und einer guten Reproduzierbarkeit. Im Vergleich zu den CLP- und CASP-Modell erscheint das inflammatorische Zytokin-Profil bei Endotoxin-Exposition von einem schnelleren und stärkeren Anstieg gekennzeichnet {Stortz et al. 2017}.

#### 4.1.2. Generalisierte Shwartzman Reaktion

Aufgrund der besseren Standardisierungs- und Reproduktions-Möglichkeiten wurde für die Induktion einer Immunreaktion das Endotoxin-Modell mittels LPS verwendet. Hierbei erfolgt die Gabe einer intravenösen, gewichtsadaptierten und letalen Dosis LPS. Hierdurch wird eine inflammatorische Reaktion induziert, mit einhergehendem Anstieg proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin 6) sowie einer Leukozytopenie {Remick et al. 2000}. 24 Stunden vor der intravenösen Verabreichung erfolgt die subkutane LPS-Gabe in geringerer Dosierung zur Induktion einer GSR. Diese ist, im Vergleich zu der einmaligen LPS-Gabe, gekennzeichnet durch das Bild einer disseminierten, intravasalen Koagulopathie (DIC) mit einhergehender mikrovaskulärer Thrombenbildung, dem Auftreten eines Multiorganversagens und einer erhöhten Letalität {Solfstra et al. 2006}. Hinsichtlich des Zytokin-Profiles ergeben sich keine Unterschiede zwischen der einmaligen Applikation von LPS und der GSR {Solfstra et al. 2006}.

Zusammengefasst beinhaltet die GSR das Auftreten einer Thrombozyto- und Leukozytopenie, einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine, die Bildung mikrovaskulärer Thromben, eine Verschlechterung der Mikrozirkulation sowie das Auftreten eines Multiorganversagens



{Butschkau et al. 2013, Solfstra et al. 2006, Remick et al. 2000}. Mit diesen Eigenschaften stellt die GSR ein einfaches, reproduzierbares und etabliertes Sepsis-Modell der Maus dar.

#### 4.1.3. Intravitalmikroskopie und Rückenhautkammermodell

Zur Evaluation der Mikrohämodynamik und quantitativen Darstellung der Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminations-Technik an einem dorsalen Rückenhautkammermodell der Maus angewandt.

Die Anwendung der Epi-Illuminations- (oder Auflicht-) Technik in der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie stellt ein anerkanntes Verfahren der Intravitalmikroskopie dar {Schreiter et al. 2017, Secklehner et al. 2017, Laschke et al. 2011}. Durch die intravenöse Verabreichung von FITC-Dextran können selektiv das Blutplasma zur Kontrastierung der mikrovaskulären Gefäße angefärbt und somit Hämodynamik-, Gefäß- und Extravasationsparameter erhoben werden {Schreiter et al. 2017, Laschke et al. 2011}. Darüber hinaus können durch die Hinzugabe von Rhodamin die Leukozyten und Thrombozyten angefärbt und somit Aussagen über die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion getroffen werden {Schreiter et al. 2017, Laschke et al. 2011}. Neben der Epi-Illuminations-Technik findet auch die Trans-Illumination in der Intravitalmikroskopie eine Anwendung. Diese hat jedoch den Nachteil, dass die zu untersuchende Region von der Gewebe-Dicke abhängig ist und somit erheblich limitiert sein kann.

Hinsichtlich der Anwendung der Intravitalmikroskopie können akute und chronische Modelle unterschieden werden {Vajkoczy et al. 2000}. Bei den akuten Modellen werden mikrovaskuläre Strukturen z.B. im Bereich des *Musculus cremaster*, der Leber oder der Milz zur Darstellung gebracht {Secklehner et al. 2017, Vajkoczy et al. 2000}. Ein großer Nachteil dieser Verfahren sind die Größe des chirurgischen Eingriffes und die damit verbundene Limitation hinsichtlich fortlaufender Untersuchungen an demselben Tier {Secklehner et al. 2017}.

Zu den chronischen Modellen der Intravitalmikroskopie zählt die Präparation einer dorsalen Rückenhautkammer {Laschke et al. 2011, Vajkoczy et al. 2000}. Seit der erstmaligen Beschreibung 1943 durch Algire et al. wurde dieses Modell über die Jahrzehnte weiter modifiziert und entwickelte sich zunehmend zu einem etablierten Verfahren in der intravitale Untersuchung mehrerer Forschungs-Schwerpunkte wie z.B. der Mikrozirkulation, der Vaskularisation von autologen oder allogenen Gewebe, der Wundheilung, der Thrombose, der Kompatibilität von Biomaterialien oder der Tumorgenese {Schreiter et al. 2017, Laschke et al. 2011}. Der Vorteil besteht in der Möglichkeit einer repetitiven, nicht invasiven Durchführung der Intravitalmikroskopie an demselben Versuchstier über bis zu 3 Wochen hinweg {Schreiter et al. 2017, Laschke et al. 2011}. Dadurch wird die Datenerhebung maximiert und gleichzeitig die Anzahl notwendiger Versuchstiere minimiert {Laschke et al. 2011}. Zudem erfolgt die Präparation ca. 2 bis 3 Tage vor den Experimenten, sodass das Ausmaß der chirurgi-

schen Präparation auf den Verlauf des Experimentes geringgehalten wird {Laschke et al. 2011}.

Somit stellt die Intravitalmikroskopie der dorsalen Rückenhautkammer ein geeignetes und ressourcensparendes Verfahren dar, um repetitive Untersuchungen an einem Sepsis-Modell zu ermöglichen.

#### 4.1.4. *Air-Pouch* Modell

Nach initialer Detektion eingedrungener Erreger durch das angeborene Immunsystem erfolgt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung des Komplementsystems. In deren Folge bewirkt u.a. das TNF- $\alpha$ , das Interleukin-8, das C5a sowie weitere Chemokine eine gesteigerte transendotheliale Migration von Leukozyten zum Ort des Infekt-Geschehens {Schramm et al. 2000}. Somit kommt der Rekrutierung von Leukozyten in den extravasalen Raum eine entscheidende Bedeutung in der Pathophysiologie der Sepsis zu. Um das Ausmaß dieser Leukozyten-Extravasation während der GSR zu erfassen, erfolgte zu einem die Auszählung CAE positiver Zellen in das Lungen- und Leber-Gewebe sowie die quantitative Analyse von Leukozyten in einem *Air-Pouch* Modell.

Bei einem *Air-Pouch* handelt es sich um ein *in vivo* Modell zur Untersuchung akuter oder chronischer Entzündungsreaktionen {Duarte et al. 2016}. Hierbei wird, im Bereich des Rückens einer Maus oder Ratte, durch die repetitive, subkutane Injektion von steriler Luft ein Hohlraum geschaffen {Duarte et al. 2016, Schramm et al. 2000}. Nach ca. 6 Tagen entsteht eine, den Hohlraum auskleidende Zellschicht aus Makrophagen- und Fibroblasten-artigen Zellen, ähnlich einer synovialen Membran {Edwards et al. 1981}. Anschließend können lokale Entzündungsreaktionen durch die Injektion von z.B. Carrageenan, Mykobakterien, LPS, Lipiden, Zymosan oder TNF- $\alpha$  ausgelöst und im zeitlichen Intervall der Inhalt des *Air-Pouches* wieder aspiriert und hinsichtlich diverser Parameter untersucht werden (z.B. Zytokin-Konzentrationen, Anzahl der Leukozyten) {Duarte et al. 2016}.

Für die transendotheliale Rekrutierung von Leukozyten ist TNF- $\alpha$  ein wichtiger Bestandteil {Smart et al. 1994}. Die Wirkung von TNF- $\alpha$  erfolgt indirekt durch die Induktion und Sekretion weiterer Chemokine {Schramm et al. 2000}. In der Arbeitsgruppe um Schramm et al. konnte in einem *Air-Pouch* Modell der Maus eine Zeit- und Dosis-abhängige Rekrutierung von überwiegend neutrophilen Granulozyten nach Injektion von TNF- $\alpha$  dargestellt werden. Die größte Anzahl von Leukozyten im *Air-Pouch* konnte 4 Stunden nach Injektion von 0,1 $\mu$ g TNF- $\alpha$  gemessen werden {Schramm et al. 2000}.

In der hier vorliegenden Studie wurde das *Air-Pouch* Modell während einer generalisierten Entzündungsreaktion (GSR) angewandt, um quantitative Unterschiede in den untersuchten Gruppen (WT, PZko, ZPIko) hinsichtlich der extravasalen Leukozyten-Rekrutierung als einen

inflammatorischen Parameter zu erfassen. Um eine möglichst maximale Leukozyten-Migration in den *Air-Pouch* zu erhalten, wurden die Erkenntnisse um die Arbeitsgruppe von Schramm et al. hinsichtlich der Zeit- und Dosis-abhängigen Rekrutierung einbezogen {Schramm et al. 2000}. Kritisch zu diskutieren ist hierbei die Beeinflussung des Extravasations-Verhaltens durch die GSR selbst. Diesbezüglich gibt es in der Literatur keine Vergleichswerte. Aufgrund einer generalisierten Immunreaktion ist jedoch von einer beschleunigten Migration auszugehen, sodass der *Peak* der Leukozyten-Extravasation ggf. früher zu erwarten ist. In den Untersuchungen von Schramm et al. ergab sich zwischen der 4. und 8. Stunde ein im Verhältnis gesehen geringer Abfall der Neutrophilen-Anzahl im Exsudat {Schramm et al. 2000}, sodass eine vermutete Linksverschiebung dieser „Extravasations-Kurve“ einen nur geringen Effekt haben dürfte. Zudem erfolgten die Untersuchungen innerhalb der Gruppen zu dem fest definierten und damit gleichen Zeitpunkt. Somit kann der genaue Zeitpunkt der eigentlichen maximalen Leukozyten-Extravasation vernachlässigt werden kann.

#### 4.1.5. Interleukin 10

Neben dem *Tumor growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist das Interleukin 10 (IL-10) eines der wichtigsten Zytokine zur Limitation eines Infektionsgeschehens {Grütz 2005}. Es wird während einer proinflammatorischen Immunreaktion von diversen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems gebildet (z.B. dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, B- sowie T-Lymphozyten) und hat verschiedenste immunmodulatorische Eigenschaften {Ng et al. 2013}. Das Interleukin-10 wirkt antiinflammatorisch und immunsuppressiv durch die antigenpräsentierenden Zellen vermittelte Reduktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL 12, IL 18) und Chemokine (CXC und CC) {Grütz 2005, Oberholzer et al. 2002}. Weiterhin wird die Funktion der Cyclooxygenase-2 beeinflusst, sodass die NO-Produktion herabgesetzt wird {Grütz 2005}.

Bei der vorliegenden Studie erfolgte die Analyse der IL-10 Plasmakonzentrationen vor und 8,5 Stunden nach Induktion der GSR, um das antiinflammatorische Zytokin-Profil innerhalb der Gruppen zu erfassen. In Patienten mit einem septischen Krankheitsbild konnte eine gute Korrelation zwischen hohen und anhaltenden IL-10 Plasmakonzentrationen sowie der Schwere der Sepsis bzw. damit einhergehenden schlechten Outcome gezeigt werden {Li X et al. 2017, Oberholzer et al. 2002, Gogos et al. 2000}. Somit kann die IL-10 Plasmakonzentration am Ende der GSR als Indikator für die Schwere der Immunreaktion angesehen werden.

#### 4.1.6. *Knock-out* Modell

Die gezielte Deaktivierung von Genen in der Maus stellt einen wichtigen Baustein in der Grundlagenforschung von Erkrankungen dar. Die in der vorliegenden Studie genutzten PZ- und ZPI-*knock out* Mäuse zeichnen sich durch eine entsprechende Defizienz von PZ bzw. ZPI aus {Zhang et al. 2008}. Da die beiden Komponenten im Blutplasma in einem PZ-ZPI-Komplex zirkulieren, wird die Plasmakonzentration durch den jeweiligen Partner beeinflusst {Tabatabai et al. 2001}. So wurde in der Gruppe um Zhang et al. eine verminderte PZ- (auf 57%) bzw. ZPI-Konzentration (auf 72%) in den jeweiligen defizienten Mäusen gemessen {Zhang et al. 2008}. Neben der eigenen Defizienz wird somit zusätzlich das jeweilige *knock-out* Modell durch eine verminderte Plasmakonzentration von PZ bzw. ZPI beeinflusst. In Anbetracht einer großen physiologischen Spannbreite der Plasmakonzentrationen in der gesunden Normalbevölkerung scheinen diese Unterschiede jedoch von geringerer Bedeutung. Dennoch sollten sie in der Betrachtung der Ergebnisse mit einbezogen werden {Zhang et al. 2008}. Darüber hinaus werden die Plasmakonzentrationen durch hormonelle Faktoren beeinflusst. So geht die Einnahme oraler Kontrazeptiva mit erhöhten PZ- und ZPI-Plasmakonzentrationen einher {Al-Shanqeeti et al. 2005}. Um eine mögliche hormonelle Beeinflussung der Plasmakonzentrationen entgegenzuwirken, wurden bei der vorliegenden Studie nur männliche Versuchstiere angewandt. Die Analyse der Plasmakonzentrationen erfolgte mithilfe eines etablierten und kommerziell erhältlichen Standard-ELISA-Kits.

### 4.2. Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1. GSR als Sepsis-Modell der Maus

Die Pathophysiologie einer Sepsis ist gekennzeichnet durch die Aktivierung der Inflammation und Koagulation mit konsekutiver Endothelzellfunktion sowie Störung der Mikro- und Makrozirkulation {Ertmer et al. 2016}. In der vorliegenden Studie erfolgte zunächst die Beurteilung der WT Gruppe hinsichtlich der Mikrohämodynamik, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie des Extravasationsverhalten nach Induktion einer GSR. Ergänzend wurden laborchemische Analysen hinsichtlich der Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenanzahl sowie der IL-10 Plasmakonzentration durchgeführt.

Nach Induktion der GSR stellte sich bereits ab der ersten Stunde eine signifikante Verschlechterung der Mikrohämodynamik ein, gekennzeichnet durch die Abnahme des VBF, der WSR sowie der FCD. Diese Ergebnisse stimmen mit weiteren Erkenntnissen tierexperimenteller Untersuchungen {Caldwell et al. 2018, Butschkau et al. 2013, Alfieri et al. 2012, Hoffmann et al. 1999} sowie mit dem pathophysiologischen Verständnis einer Sepsis überein {Uhle et al. 2015, Ellis et al. 2005}. Als Ursache für die multifaktoriell bedingte Verschlechterung

rung der Mikrohämodynamik wird u.a. eine Endothelzelldysfunktion angenommen, bestehend aus einer progredienten Vasoplegie sowie einer erhöhten mikrovaskulären *Leackage*. So führt z.B. die über LPS und den TLR4 vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zur Transkription der induzierbaren-NO-Synthase in den Endothelzellen sowie Makrophagen und konsekutiv zur Produktion großer Mengen an NO {Wendel et al. 2009}. NO wirkt an den Gefäßen vasodilatatorisch {Sharawy et al. 2014}. Darüber hinaus scheint eine vermehrte Synthese von Prostacyclin sowie der *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF) eine entscheidende Rolle in der „akuten“ Vasodilatation zu spielen {Ohashi et al. 2012}. Weitere, spätere Faktoren im Verlauf einer Sepsis sind eine progrediente Resistenz adrenerger Rezeptoren gegenüber endogener Katecholamine sowie ein zunehmender Vasopressinmangel {Ertmer et al. 2016}. Die zunehmende Vasodilatation führt nicht nur in der Mikro- sondern auch in der Makrohämodynamik zur Entstehung einer Hypotonie. Ungünstig beeinflusst wird dieser Zustand durch einen direkten, negativen inotropen Einfluss von TNF- $\alpha$  sowie C5a auf das Myokard {Uhle et al. 2015}. Eine erhöhte mikrovaskuläre *Leackage* kann u.a. durch einen, Zytokin-vermittelten Anstieg von Angiopoetin 2 und der damit einhergehenden Destabilisierung der Barrierefunktion des Endothels hervorgerufen werden {van der Heijden et al. 2009}. Weiterhin führt eine Hypoxie vermittelte, vermehrte Ausschüttung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) über die Wirkung an VEGF-2 Rezeptoren zu einer progredienten Inaktivierung endothelspezifischer Adhäsionsmoleküle {Dejane et al. 2008}. Auch eine direkte Schädigung der Endothelzellen durch sezernierte Produkte der Leukozyten (z.B. Proteasen, Oxidanzien) während der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion spielt eine wichtige Rolle in der Ausprägung der *Leakage* {Ertmer et al. 2016}. Durch die generalisierte Erhöhung der mikrovaskulären *Leakage* entsteht zudem ein progrediente Flüssigkeitsverschiebung nach extravasal. Dies kann den hypotonen Zustand während der Sepsis begünstigen {Ertmer et al. 2016}. Auch in der vorliegenden Studie erfolgte die Messung der *Leakage* im Bereich der Arteriolen und Venolen der Mikrozirkulation. In der WT-Gruppe ergab sich lediglich peri-arteriolär und nach 8 Stunden GSR eine signifikante, pathophysiologisch jedoch irrelevante Erhöhung im Vergleich zu den Baseline-Werten. Darüber hinaus ist nur eine gering ansteigende, nicht signifikante Tendenz über die 8 Stunden zu erahnen. Eine mögliche Ursache für den fehlenden, signifikanten Anstieg der *Leakage* könnte eine zu frühe Messung innerhalb des Modells darstellen unter der Annahme, dass die *Leakage* eine Spät-Erscheinung innerhalb der Sepsis darstellt. So konnte z.B. in tierexperimentellen Untersuchungen an der Maus eine erhöhte *Leakage* nach 23 Stunden (intraperitoneale Gabe von LPS zur Stunde 0 und Stunde 19, {Alfieri et al. 2012}) bzw. nach 12 Stunden (CLP-Modell einer Sepsis, {Zhou et al. 2012}) gemessen werden. Möglich ist aber auch eine Kumulation durch die repetitive, intravenöse FITC-Dextran-Gabe. Da während der GSR eine Verschlechterung der Mikrohämodynamik eintritt, ist auch von einer Verschlechterung der Nierenfunktio-

on auszugehen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Slofstra et al. unterstützt. Hier konnte während der GSR eine Verdopplung der Kreatinin-Konzentration nach 6 Stunden festgestellt werden {Slofstra et al. 2006}. Da FITC-Dextran überwiegend renal ausgeschieden wird, ist eine Kumulation durchaus anzunehmen. Um diesen Effekt entgegenzuwirken, wurde bereits während der GSR die intravenöse Dosierung angepasst (1h: 1ml, 5h: 0,8ml, 8h: 0,6ml). Dennoch könnte durch die FITC-Dextran-Kumulation und ggf. zu eng gewählte Untersuchungsabstände sich vermehrt FITC-Dextran intravasal anreichern und dies mathematisch zu einer geringeren *Leakage* führen.

Neben der Reduktion des VBF in den Arteriolen und Venolen stellte sich eine signifikante Abnahme der FCD über die 8 Stunden GSR hinweg dar. Dieses Ergebnis geht einher mit der Zunahme einer heterogenen, kapillären Perfusion, d.h. der gleichzeitigen Darstellung „normaler“, „hyperperfundierten“- und sogenannten *stopped-flow* Kapillaren. Dieses Phänomen ist ebenfalls Bestandteil der septischen Pathophysiologie {Ertmer et al. 2016, Ellis et al. 2005}. Für die Abnahme der gemessenen FCD ist das Auftreten der *stopped-flow* Kapillaren hauptverantwortlich. Zu deren Entstehung tragen, neben den bereits oben genannten Mechanismen der Endothelzelldysfunktion (Vasodilatation, *Leackage*) auch eine erhöhte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die septische Koagulopathie mit einhergehender Bildung von Mikrothromben bei {Ellis et al. 2005, Spronk et al. 2004}. Zudem begünstigen auch rheologische Eigenschaften des Blutes, wie eine verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten während einer Sepsis die Entstehung der *stopped-flow* Kapillaren {Reggiori et al. 2009}. Als Kennzeichen eines proinflammatorischen Zustandes während der GSR stellte sich, neben der Verschlechterung der Mikrohämodynamik, eine anhaltende Erhöhung der leukozytären Adhärenz, eine signifikante leukozytäre Extravasation (in der Lunge um das 3,7 Fache, in der Leber um das 12 Fache), eine Leukozytopenie (um ca. 60%) sowie ein Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration (um das 12 Fache) experimentell dar. Der deutliche Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration deckt sich mit den Erkenntnissen nach *double hit* Gabe von LPS in der Arbeitsgruppe um Slofstra et al. {Slofstra et al. 2006}. Auch im klinischen Erscheinungsbild zeigt ein septischer Patient erhöhte IL-10 Plasmakonzentrationen {Li X et al. 2017, Oberholzer et al. 2002, Gogos et al. 2000}. Die Ursache liegt zunächst in der durch LPS induzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, durch dessen Wirkung auf diverse Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems eine aggravierte Transkription von IL-10 eingeleitet wird {Ng et al. 2013}. Diese als *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS) bezeichneten Phase ist gekennzeichnet von einer zunehmenden Apoptose immunologischer Zellen {Vollmar 2011, Hotchkiss et al. 2003}. Dieser Verlust der Immunzellen könnte, neben der verstärkten leukozytären Adhärenz und der damit einhergehenden, progredienten Extravasation eine wesentliche Ursache, für die sich darstellende systemische Leukozytopenie nach 8 Stunden GSR darstellen. Auffällig in den Ergebnissen ist, dass der

Anstieg der leukozytären Adhärenz in den Venolen bereits in der ersten Stunde der GSR sein Maximum erreicht und anschließend in der Ausprägung konstant bleibt. Der Abfall der hämodynamischen Parameter (VBF, WSR) ist dahingehend kontinuierlich und unterliegt scheinbar erst am Ende der GSR einer gewissen Konstanz. So scheint die Verschlechterung der Hämodynamik der leukozytären Adhärenz „zu folgen“ bzw. durch diese bedingt zu sein. Diese könnte u.a. die Folge einer direkten Strömungsbehinderung durch die multiplen, adhären-ten Leukozyten sein. Darüber hinaus trägt die anhaltende Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit einhergehender, progredienter Endothelzellschädigung, progredienter *Leackage* sowie extravasalen Flüssigkeitsverschiebung ebenfalls zu einer deutlichen Verschlechterung der Mikrohämodynamik bei.

Neben einer Leukozytopenie stellt sich nach 8 Stunden GSR in der WT Gruppe auch eine signifikante Thrombozytopenie um ca. 60% dar. Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen tierexperimentellen Sepsis-Modellen erhoben werden {Mathiak et al. 2000}. Die Thrombozytopenie kann als Resultat einer aktivierten septischen Koagulopathie interpretiert werden. Auch im Verlauf einer humanen Sepsis ist die Thrombozytopenie ein häufiges Erscheinungsbild und ist bei intensivstationären Patienten mit einem schlechten Outcome vergesellschaftet {Dewitte et al. 2017}.

Weiterhin ergab sich eine leichte Erythrozytopenie am Ende der 8 Stunden GSR mit einem signifikanten Abfall der Erythrozytenanzahl um ca. 10% (ca. 13% Abfall des Hämoglobins, Daten nicht dargestellt). Auch beim Menschen wird eine Infektions-assoziierte Anämie beschrieben. Diagnostiziert wird diese ab einem Abfall des Hämoglobins unter 8 g/dl. Jedoch tritt diese nach Tagen auf und die Ursachen liegen in einem zunehmenden Eisenmangel, einer Zytokin-bedingten Suppression der Erythropoese, in einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten sowie in einer gesteigerten Erythrophagozytose durch aktivierte Makrophagen {Nemeth et al. 2014}. Vielmehr scheint die vorliegende, moderate Erythrozytopenie Resultat einer durch die regelmäßigen Injektionen bedingte Hämodilution zu sein. Auch die durch die GSR initiierte disseminierte, intravasale Gerinnung kann durch die vermehrte Thrombenbildung zu der geringen Senkung der Erythrozytenanzahl beitragen. Darüber hinaus kann die durch die Sepsis bedingte Abnahme der Erythrozytenverformbarkeit zu einem gesteigerten Abbau bzw. Destruktion beitragen {Ellis et al. 2005}.

Zusammengefasst resultieren die Untersuchungen der GSR in einer deutlichen Aktivierung der Inflammation (Abnahme der Mikrohämodynamik, Anstieg der leukozytären Extravasation, Leukozytopenie, Anstieg der IL-10 Plasmakonzentration) sowie Koagulation (Thrombozytopenie, Abnahme der FCD) und beschreiben somit pathophysiologische Elemente eines Sepsis-Modells.

#### 4.2.2. Wirkung der PZ-Defizienz während einer GSR

In den PZ-defizienten Tieren ergaben sich im Vergleich zu den WT-Tieren keine Unterschiede im Verlauf der Mikrohämodynamik (VBF, WSR, FCD) sowie im Ausmaß der Thrombozyto- und Erythrozytopenie während der GSR. Jedoch konnte sowohl nach 4 im *Air-Pouch* (um das 2-Fache) als auch nach 8,5 Stunden GSR in dem Lungen- und Lebergewebe (jeweils um das 1,4-Fache) eine erhöhte, leukozytäre Extravasation in den PZ-defizienten Tieren beobachtet werden. Ergänzend stellte sich, vermutlich als Resultat der beschleunigten Extravasation, eine signifikante Reduktion der leukozytären Adhärenz über den Verlauf der GSR in den PZko Tieren dar.

Die Ergebnisse deuten auf eine Akzeleration der transendothelialen, leukozytären Migration in den PZ-defizienten Tieren nach Induktion der GSR hin. Die Ursache könnte beispielsweise in einem direkten Wirkmechanismus der PZ-Defizienz auf Mechanismen der Extravasation liegen. Diesbezüglich sind zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbaren Studien vorliegend. Eine weitere mögliche Ursache könnte in einer, durch die PZ-Defizienz hervorgerufenen, aggravierten Inflammation liegen. Hierfür spricht das frühzeitige Auftreten einer Leukozytopenie nach bereits 4 Stunden GSR (auf ca. 44% im Vergleich zu den WT Mäusen) sowie eine um das doppelte erhöhte IL-10 Plasmakonzentration am Ende der GSR im Vergleich zu den WT Tieren. Darüber hinaus konnte, innerhalb unserer Arbeitsgruppe, ein stärkerer, signifikanter Anstieg der IL-6 Plasmakonzentration nach 4 Stunden GSR in den PZ-defizienten Mäusen dargestellt werden {Butschkau et al. 2013}. Somit liegt bei den Tieren der PZko Gruppe, neben einer aggravierten Leukozytopenie, eine deutlich akzentuiertes pro- und anti-inflammatorisches Zytokinprofil während der GSR vor, als Hinweis einer aggravierten, inflammatorischen Reaktion.

Über mögliche anti- bzw. pro-inflammatorische Eigenschaften des PZ gibt es in der Literatur nur wenige Untersuchungen. So konnte z.B. eine inverse Korrelation hinsichtlich der IL-6 und PZ-Plasmakonzentrationen sowie eine reduzierte PZ-Synthese in TNF- $\alpha$  exponierten Hepatozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden {Vasse et al. 2006, Vasse et al. 2002, Undar et al. 1999}. Als Gemeinsamkeit dieser Studien kann eine negative Beeinflussung der PZ-Plasmakonzentration durch erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine postuliert werden. Im Umkehrschluss könnte eine PZ-Defizienz ggf. das vermehrte Auftreten proinflammatorischer Zytokine begünstigen über einen bisher unbekannten Mechanismus. Der in der Literatur implizierte „anti-inflammatorische Phänotyp“ des PZ scheint sich somit durch die vorliegenden Ergebnisse der Studie zu bestätigen.

Ähnliche, anti-inflammatorische Effekte von Komponenten der physiologischen Koagulation konnten in tierexperimentellen Untersuchungen z.B. für das Antithrombin III sowie das rekombinante, aktivierte Protein C gezeigt werden, obgleich die klinische Anwendung von Antithrombin III in der Sepsis-Therapie kein Überlebensvorteil darstellte {Hagel et al. 2011}. Auf-



grund gegensätzlicher Ergebnisse in klinischen Studien wird auch der Einsatz von rhAPC, entsprechend der internationalen SSC Leitlinien, nicht mehr empfohlen {Kumar 2019, Ranieri et al. 2012, Hosac 2002, Bernard et al. 2001}.

Protein C (PC) ist eine Serinprotease, dessen zymogene Vorstufe in der Leber synthetisiert wird und im Blut zirkuliert {Foster et al. 1985}. Im Rahmen seiner anti-koagulatorischen Funktion bindet das Protein C an einen *endothelial protein C receptor* (EPCR) der Endothelzellen {Foley et al. 2016}. Darüber hinaus wird Thrombin an der Endothelzelloberfläche über Thrombomodulin (TM) gebunden {Levi et al. 2004}. Erst durch die Bildung eines PC-EPCR-Thrombin-TM-Komplexes wird das Protein C in aktiviertes PC (aPC) gespalten {Foley et al. 2016}. Nach Dissoziation des aPC von dem Komplex sowie Anlagerung an negative Phospholipide aktivierter Thrombozyten oder Endothelzellen kommt es -in Anwesenheit von Protein S und Calcium- zur Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren FVa sowie FVIIIa {Foley et al. 2016}. Als Verbindungsglied zwischen Koagulation und Inflammation werden dabei die PAR-Rezeptoren gesehen {Ertmer et al. 2016}. PAR-Rezeptoren werden auf diversen Zellen exprimiert, z.B. auf Endothelzellen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen sowie verschiedenen Zellen des Immunsystems {Foley et al. 2016}. Es werden 4 Subtypen unterschieden, wobei dem PAR1-Rezeptor eine entscheidende Bedeutung zukommt. Dieser wird durch Thrombin, Faktor Xa sowie TF-FVIIa gespalten und kann eine zelluläre Apoptose, Thrombozytenaktivierung sowie die Bildung proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL6 und IL8) initiieren {Ertmer et al. 2016}. Bleibt nun das aPC an einem EPCR gebunden, so kann über die Spaltung und Aktivierung des PAR-Rezeptors eine antiinflammatorische Signalkaskade durch die Suppression proinflammatorischer Zytokine initiiert werden {Foley et al. 2016, Lipinski et al. 2011}. Da PZ keine Serin-Protease Funktion besitzt, die Aktivierung der PAR-Rezeptoren jedoch eine proteolytische Spaltung voraussetzt, ist eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung des PZ über eine direkte PZ-PAR-Interaktion sicherlich nicht ausgeschlossen, jedoch unwahrscheinlich. Denkbar wäre auch eine Wirkung des PZ als Cofaktor für eine bisher unbekannte Protease, wodurch diese den PAR-Rezeptor beeinflussen kann. Da die ZPI-defizienten-Tiere keine Veränderungen hinsichtlich des inflammatorischen Verhaltens im Vergleich zum WT aufweisen, scheint eine möglich anti-inflammatorische Wirkung des PZ, vermittelt durch das ZPI, unwahrscheinlich.

Als Resultat einer aggravierten, inflammatorischen Reaktion weisen die PZ-defizienten Tiere eine akzelerierte, transendotheliale Migration auf. In der Pathophysiologie einer Sepsis kommt der Rekrutierung immunologischer Zellen in das perivaskuläre Gewebe eine entscheidende Bedeutung zu. Initiiert wird die Extravasation durch mehrere, simultan ablaufende Mechanismen der Inflammation und Koagulation. So führt die Aktivierung des Komplementsystems zur vermehrten Bildung von C5a. Das C5a kann nun an G-Protein gekoppelte C5a Rezeptoren der Endothelzellen binden und führt zur vermehrten Expression der P-

Selektine {Foley et al. 2016, Oberholzer et al. 2001}. Darüber hinaus führt die Detektion von PAMPs (z.B. LPS) durch TLR4-Rezeptor tragende Zellen zu einer gesteigerten Transkription und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine {Cohen 2002}. TNF- $\alpha$  induziert eine Hochregulierung der E-Selektine auf den Endothelzellen {Oberholzer et al. 2001}. Durch die Wirkung von C5a sowie der proinflammatorischen Zytokine kommt es zudem zur vermehrten Expression von TF an Endothel- und Immunzellen sowie konsekutiv zur Initiierung der Gerinnungskaskade mit Bildung von Thrombin {Levi 2007, Trappe et al. 2005}. Durch die Wirkung von Thrombin über die PAR1 Rezeptoren der Endothelzellen werden ebenfalls vermehrt E- und P-Selektine in die Membran der Endothelzellen eingebaut {Foley et al. 2016}. Mithilfe der P- und E-Selektine wird es den Immunzellen (v.a. Monozyten und Neutrophilen) ermöglicht, mithilfe von PSGL-1 und L-Selektinen entlang des Endothels „zu rollen“ {Lim et al. 1998}. Hierdurch werden die „rollenden“ Leukozyten weiteren Zytokinen ausgesetzt (IL-8). Dies führt durch Konformationsänderung leukozytärer Integrine (u.a. LFA-1, CR3) zur Bindung an Zelladhäsionsmolekülen des Endothels (ICAM-1, VCAM-1) {Petri et al. 2006, Oberholzer et al. 2001}. Zudem führt eine Thrombin abhängige Aktivierung des PAR1 Rezeptors zu einer gesteigerten Expression dieser Adhäsionsmoleküle {Foley et al. 2016}. Nach Bildung einer festen Leukozyten-Endothelzellverbindung wird die transendotheliale Migration entlang eines Konzentrationsgradienten an Chemokinen initiiert {Oberholzer et al. 2001}. Aufgrund der Komplexität dieser Mechanismen und der daraus resultierenden multiplen Möglichkeiten einer Beeinflussung durch die PZ-Defizienz ist zum aktuellen Zeitpunkt der genaue Wirkmechanismus nicht zu bestimmen. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die molekularen Mechanismen dieser akzelerierten Inflammation bzw. Leukozyten-Extravasation aufzuklären.

Obwohl hinsichtlich der Koagulation ein leicht prothrombotischer Phänotyp in der Literatur vermutet wird {Sofi et al. 2009, Zhang et al. 2008, Santacroce et al. 2006, Heeb et al. 2002, Vasse et al. 2001, Yin et al. 2000}, führte die GSR in den PZ-defizienten Mäusen zu keiner signifikanten Aggravation der Thrombozytopenie oder der Gefäßthromben-Bildung in den untersuchten Leberschnitten.

Zusammengefasst führte eine PZ-Defizienz zum Auftreten einer aggravierten Immunreaktion mit einer akzelerierten, transendothelialen Migration der Leukozyten. Diese Wirkung der PZ-Defizienz scheint im umschriebenen Maße aufzutreten, da es z.B. innerhalb der Gruppe zu keiner erhöhten Mortalität der Tiere kam. Eine Beeinflussung der PZ-Defizienz hinsichtlich der Koagulation konnte nicht gezeigt werden.

#### 4.2.3. Wirkung der ZPI-Defizienz während einer GSR

Die Untersuchungen der ZPI-Defizienz wiesen hinsichtlich der mikrohämodynamischen Verschlechterung während der GSR keine Unterschiede im Vergleich zu den WT-Tieren auf. So fielen die entsprechenden Parameter (VBF, WSR, FCD) nahezu „parallel“ zu denen der WT-Gruppe über die 8 Stunden hinweg ab. Auch hinsichtlich der leukozytären Extravasation konnten keine Unterschiede in dem *Air-Pouch* als auch in dem Leber- und Lungengewebe beobachtet werden. Ebenfalls war das Ausmaß der Leukozytopenie (nach 4,5 als auch 8,5 Stunden GSR) sowie der IL-10 Plasmakonzentration (nach 8,5 Stunden GSR) ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zu den WT-Tieren. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnten auch keine Unterschiede hinsichtlich der IL-6 Plasmakonzentrationen nach 4 Stunden GSR gezeigt werden {Butschkau et al. 2013}. Somit scheint eine ZPI-Defizienz keinen Effekt auf das Ausmaß der Inflammation bzw. der leukozytären Extravasation zu besitzen. Hinsichtlich inflammatorischer Eigenschaften des ZPI gibt es kaum Untersuchungen in der Literatur. Girard et al. vermuteten, aufgrund des Anstieges der ZPI-Konzentration in einem akuten Phase-Modell der Maus, eine Bedeutung des ZPI als einen möglichen akuten Phase-Reaktanten {Girard et al. 2013}. Diese Vermutung lässt jedoch keine konkreten Rückschlüsse auf eine mögliche inflammatorische Potenz des ZPI zu. Darüber hinaus deuten weitere Ergebnisse innerhalb unserer Arbeitsgruppe ebenfalls auf eine fehlende inflammatorische Potenz des ZPI hin {Butschkau et al. 2013}.

Hinsichtlich der leukozytären Adhärenz konnten während der GSR in den Arteriolen sowie in der 1. Stunde der Venolen keine Unterschiede zu den WT-Tieren beobachtet werden. Jedoch zeigte sich in der 5. und 8. Stunde der GSR eine verminderte leukozytäre Adhärenz in den Venolen, ähnlich dem Verlauf der PZ-defizienten Tiere. Da die Daten der vorliegenden Studie auf eine aggravierte Leukozyten-Extravasation mit einhergehender, verminderter leukozytären Adhärenz in den PZ-defizienten Tieren hinweisen, könnte die Ursache dieser „späten“, verminderten leukozytären Adhärenz der ZPIko-Mäuse in einer reduzierten PZ-Plasmakonzentration liegen. In der Gruppe um Zhang et al. konnte eine verminderte PZ-Plasmakonzentration in den ZPIko Mäusen auf ca. 57% im Vergleich zu den WT-Tieren nachgewiesen werden {Zhang et al. 2008}. Ursache ist die überwiegend komplexgebundene Zirkulation von PZ und ZPI im Blut {Tabatabai et al. 2001}. Zudem kommt es während der GSR im Rahmen der inflammatorischen Reaktion zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Wie bereits beschrieben, konnte durch Vasse et al. eine Reduktion der PZ-Synthese in der Leber und der Endothelzellen durch z.B. TNF- $\alpha$  gezeigt werden {Vasse et al. 2006}, sodass während der GSR von einer Reduktion der PZ-Synthese auszugehen ist. Da nun in den ZPI-defizienten Tieren bereits eine geringere „Ausgangskonzentration“ an PZ vorliegt, ist es denkbar, dass sich additiv die PZ-Plasmakonzentration während der GSR dramatischer reduziert in den ZPIko- im Vergleich zu den WT-Mäusen. Somit würde die ausgeprägtere

„PZ-Defizienz“ in den ZPIko Tieren wohlmöglich eine „schnellere“ Leukozyten-Extravasation bewirken im Vergleich zu den WT-Tieren, jedoch im deutlich geringeren und späteren Ausmaß als in den PZko Mäusen. Diese deutlich spätere Extravasation würde auch den fehlenden Unterschied hinsichtlich der Extravasations-Daten in den ZPIko Mäusen erklären. Um diese Hypothesen zu bestätigen, sind jedoch weitere Untersuchungen hinsichtlich der PZ-Plasmakonzentration innerhalb der beiden Gruppen und während einer GSR nötig.

Hinsichtlich des Verbrauches an Thrombozyten und Erythrozyten ergaben sich keine Unterschiede zwischen einer ZPI-Defizienz und den WT-Tieren während der GSR. In den ZPIko Mäusen konnte nach 8,5 Stunden GSR eine signifikant (um ca. 8%) erhöhte Anzahl an Gefäßthromben ausgezählt werden. Dies deutet auf eine aggravierte *disseminated intravascular coagulation* (DIC) als Resultat einer gesteigerten Koagulation während der GSR in den ZPI-defizienten Tieren hin. Ergänzend konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe in einem photochemisch induzierten Thrombose-Modell der Maus nach 4 Stunden GSR eine akzelerierte Gefäßokklusion in den Venolen der ZPIko Mäuse beobachtet werden {Butschkau et al. 2013}. Das Ergebnis der vorliegenden Studie weist somit auf einen prothrombotischen Phänotyp der ZPI-defizienten Tiere hin und stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein {Girard et al. 2019, Sofi et al. 2009, Zhang et al. 2008, Corral et al. 2006}. Dieser prothrombotische Phänotyp scheint jedoch unter physiologischen Bedingungen von moderater Bedeutung. Hierfür spricht der asymptomatische Phänotyp in den ZPIko Mäusen {Zhang et al. 2008}. In Konkordanz zu den Untersuchungen um die Arbeitsgruppe von Zhang et al. konnte auch in unserer Arbeitsgruppe {Butschkau et al. 2013} gezeigt werden, dass der prothrombotische Phänotyp einer ZPI-Defizienz sich erheblich aggraviert, wenn weitere gerinnungsbeeinflussende Faktoren gegenwärtig sind. So stellt z.B. die Kombination einer Faktor V Leiden Mutation mit einer ZPI-Defizienz im Maus Modell einen schwerwiegenderen Phänotyp dar {Zhang et al. 2008}. Ebenfalls konnte, innerhalb unserer Arbeitsgruppe, in den ZPI-defizienten Tieren nur nach Induktion der GSR eine akzelerierte Gefäß-Okklusion der Venolen beobachtet werden, in den mit NaCl behandelten Tieren jedoch nicht {Butschkau et al. 2013}.

Die Ursache des prothrombotischen Phänotyps in den ZPI-defizienten Tieren während der GSR liegt in der fehlenden, anti-koagulatorischen Funktion des ZPI. Nach intravenöser Gabe des LPS, entsprechender Detektion über den TLR4-Rezeptor und konsekutiver Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine durch immunologische Zellen, erfolgt eine zytokinvermittelte (TNF- $\alpha$ , IL-6) Expression von TF durch Endothelzellen und Monozyten {Trappe et al. 2005}. Ebenfalls bewirkt -nach entsprechender Aktivierung des Komplementsystems- auch das gebildete C5a über den C5a Rezeptor der Endothelzellen eine vermehrte TF-Expression {Levi 2007, Trappe et al. 2005}. Durch die Bindung des FVII wird dieser aktiviert (FVIIa). Der TF-FVIIa-Komplex führt zum einem -über die Aktivierung des FX- zur Bildung von Thrombin

sowie -über die Aktivierung des FIX- zur Initiierung der intrinsischen Gerinnungskaskade {Esmon 2005}. Das ZPI ist nun in der Lage, die Faktoren IXa, Xa und XIa zu inaktivieren {Heeb et al. 2005, Han et al. 2000}. In Anwesenheit von PZ, Calcium-Ionen sowie Phospholipiden wird hierbei die FXa-Inaktivierung um das 1000-fache verstärkt {Han et al. 2000}. Im Umkehrschluss wirkt nun die ZPI-Defizienz während der GSR „enthemmend“ auf die initiierte, septische Koagulopathie. Die erhöhte Anzahl an Gefäßthromben in den Leberschnitten nach 8 Stunden GSR sowie die akzelerierte Gefäßokklusion nach 4 Stunden GSR {Butschkau et al. 2013} stellen somit Resultate dieser „enthemmten“, pathophysiologischen Gerinnungsaktivierung durch die ZPI-Defizienz dar. Darüber hinaus sind die Ergebnisse somit Ausdruck einer aggraviert ablaufenden Koagulation während der GSR im Vergleich zu den WT-Tieren.

Zusammengefasst hat die ZPI-Defizienz keinen inflammatorischen Einfluss während der GSR, führt jedoch zum Auftreten einer aggravierten, septischen Koagulopathie mit akzelerierter Ausbildung einer DIC.

#### 4.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine **GSR** einhergeht mit einer ausgeprägten Aktivierung der

- Inflammation,
- Koagulation sowie
- konsekutiven Verschlechterung der Mikrohämodynamik.

In Konkordanz mit Ergebnissen weiterer Studien {Butschkau et al. 2013, Solfstra et al. 2006, Remick et al. 2000} beinhaltet die GSR somit wichtige, pathophysiologische Elemente eines septischen Krankheitsbildes und stellt ein einfaches und reproduzierbares Sepsis-Modell der Maus dar. Perspektivisch können mithilfe der GSR weitere klinische Studien zur Grundlagenforschung der Pathophysiologie sowie Erprobung neuer Strategien in der Sepsis-Therapie *in vivo* untersucht werden.

Eine **PZ-Defizienz** bewirkt nach Induktion der GSR eine aggravierte Immunreaktion, gekennzeichnet durch

- eine akzelerierte, transendotheliale Leukozyten-Migration,
- konsekutiv frühzeitiger Leukozytopenie sowie durch
- ein akzentuiertes pro- und antiinflammatorisches Zytokinprofil.

Eine Beeinflussung der Mikrohämodynamik sowie der Koagulation konnte nicht beobachtet werden. Im Umkehrschluss besitzt das PZ somit eine anti-inflammatorische Wirkung bedingt durch die Hemmung der leukozytären Extravasation sowie Suppression des pro- und antiin-

flammatorischen Zytokinprofils. Der genaue Wirkmechanismus ist zum aktuellen Zeitpunkt unklar. Da eine ZPI-Defizienz eine unveränderte, inflammatorische Reaktion im Vergleich zu den WT-Tieren zeigte, ist eine anti-inflammatorische Wirkung von PZ vermutlich unabhängig von der Anwesenheit des ZPI. Denkbar wäre z.B. eine Wirkung über den PAR-Rezeptor der Endothelzellen, da dieser sowohl in der Leukozyten-Rekrutierung als auch der Freisetzung von Zytokinen während einer Sepsis eine entscheidende Rolle spielt. Weitere Studien sind somit nötig zur Aufdeckung der Wirkmechanismen. Aufgrund der anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften könnte das PZ eine mögliche Therapieoption in der Behandlung der Sepsis darstellen. Auch hierfür sind weitere präklinische und klinische Untersuchungen von großer Wichtigkeit. Darüber hinaus liegt die Bedeutung einer potentiellen, klinischen Anwendbarkeit von PZ -aufgrund der Komplexität der Sepsis-Pathophysiologie- möglicherweise in einer additiven Therapieoption, welche unter bestimmten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt der Sepsis Anwendung finden könnte.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine **ZPI-Defizienz** nach Induktion der GSR eine

- aggravierte, septische Koagulopathie mit
- akzelerierter Ausbildung einer DIC bewirkt.

Eine wegweisende Beeinflussung der Inflammation oder Mikrozirkulation konnte nicht gezeigt werden. Im Umkehrschluss wirkt das ZPI innerhalb einer GSR hemmend auf die Ausbildung vaskulärer Gefäßthromben. Die Mechanismen der anti-koagulatorischen Eigenschaften des ZPIs sind bereits bekannt und scheinen in der Komplexität der Koagulation als alleiniger Faktor eine moderate Rolle zu spielen. Interessanterweise kam es in den PZ-defizienten Tieren während der GSR nicht zu einem vermehrten Auftreten von Thromben bzw. zeigte sich innerhalb unserer Arbeitsgruppe die Gefäßokklusion der Venolen unbeeinflusst [Butschkau et al. 2013]. Somit scheint die anti-koagulatorische Wirkung des ZPI während der GSR in den PZ-defizienten Tieren unverändert. Dies bedeutet entweder, dass die Inaktivierung des FIXa und FXIa durch das ZPI unter Abwesenheit von PZ kompensatorisch so erhöht wird, dass die anti-koagulatorische Potenz des ZPI kaum beeinflusst wird, oder dass andere Proteasen kompensatorisch die Faktor Xa-Inaktivierung steigern. Zu berücksichtigen ist, dass es sich hier um ein *knock-out* Modell der Maus handelt und entsprechende Kompensationsmechanismen entsprechend von Geburt an bestehen könnten. Unabhängig davon könnte auch das ZPI eine therapeutische Rolle in der Sepsis-Therapie einnehmen, um das Ausmaß der DIC bzw. Gefäßthromben-Bildung zu beeinflussen. Bisher erfolgten diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen, jedoch sind diese notwendig, um eine mögliche therapeutische Potenz des ZPI in der Sepsis-Therapie zu eruieren.

## 5. Literaturverzeichnis

- ACCP/SCCM Conference 1992** American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis (1992). In: *Crit. Care Med.* 20 (6), S. 864–874.
- Akira et al. 2006** Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801.
- Alberti et al. 2002** Alberti, Corinne; Brun-Buisson, Christian; Burchardi, Hilmar; Martin, Claudio; Goodman, Sergey; Artigas, Antonio et al. (2002): Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. In: *Intensive Care Med* 28 (2), S. 108–121.
- Alfieri et al. 2012** Alfieri, Alessio; Watson, Jay J.; Kammerer, Richard A.; Tasab, Mohammed; Proginas, Pavlos; Reeves, Kimberly et al. (2012): Angiopoietin-1 variant reduces LPS-induced microvascular dysfunction in a murine model of sepsis. In: *Critical Care* 16 (5), R182. DOI: 10.1186/cc11666.
- Al-Shanqeeti et al. 2005** Al-Shanqeeti, Ali; van Hylckama Vlieg, Astrid; Berntorp, Erik; Rosendaal, Frits R.; Broze, George J. (2005): Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. In: *Thromb. Haemost.* 93 (3), S. 411–413.
- Angus et al. 2001** Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. In: *Crit. Care Med.* 29 (7), S. 1303–1310.
- Arefian et al. 2017** Arefian, Habibollah; Heublein, Steffen; Scherag, André; Brunkhorst, Frank Martin; Younis, Mustafa Z.; Moerer, Onnen et al. (2017): Hospital-related cost of sepsis: A systematic review. In: *The Journal of infection* 74 (2), S. 107–117. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.11.006.
- Bakhtiari et al. 2004** Bakhtiari, Kamran; Meijers, Joost C. M.; Jonge, Evert de; Levi, Marcel (2004): Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. In: *Crit. Care Med.* 32 (12), S. 2416–2421.
- Bates et al. 1997** Bates, D. W.; Sands, K.; Miller, E.; Lanken, P. N.; Hibberd, P. L.; Graman, P. S. et al. (1997): Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. In: *J. Infect. Dis.* 176 (6), S. 1538–1551.
- Bauer et al. 2006** Bauer, M.; Brunkhorst, F.; Welte, T.; Gerlach, H.; Reinhart, K. (2006): Sepsis. In: *Anaesthesist* 55 (8), S. 835–845.

- Bernard et al. 2001** Bernard, G. R.; Vincent, J. L.; Laterre, P. F.; LaRosa, S. P.; Dhainaut, J. F.; Lopez-Rodriguez, A. et al. (2001): Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. In: *The New England journal of medicine* 344 (10), S. 699–709. DOI: 10.1056/NEJM200103083441001.
- Bhakdi et al. 1991** Bhakdi, S.; Tranum-Jensen, J. (1991): Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. In: *Microbiol. Rev.* 55 (4), S. 733–751.
- Bianchi et al. 2007** Bianchi, Marco E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. In: *J. Leukoc. Biol.* 81 (1), S. 1–5.
- Bloos et al. 2017** Bloos, Frank; Rüdgel, Hendrik; Thomas-Rüdgel, Daniel; Schwarzkopf, Daniel; Pausch, Christine; Harbarth, Stephan et al. (2017): Effect of a multifaceted educational intervention for anti-infectious measures on sepsis mortality: a cluster randomized trial. In: *Intensive care medicine* 43 (11), S. 1602–1612. DOI: 10.1007/s00134-017-4782-4.
- Blum et al. 2018** Blum, Hubert E.; Müller-Wieland, Dirk (Hg.) (2018): *Klinische Pathophysiologie*. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-13-449610-9
- Bochud et al. 2001** Bochud, P. Y.; Glauser, M. P.; Calandra, T. (2001): Antibiotics in sepsis. In: *Intensive Care Med* 27 Suppl 1, S33-48.
- Bochud et al. 2003** Bochud, Pierre-Yves; Calandra, Thierry (2003): Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. In: *BMJ* 326 (7383), S. 262–266.
- Bone et al. 1989** Bone, R. C.; Fisher, C. J.; Clemmer, T. P.; Slotman, G. J.; Metz, C. A.; Balk, R. A. (1989): Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. In: *Crit. Care Med.* 17 (5), S. 389–393.
- Bouza et al. 2014** Bouza, Carmen; López-Cuadrado, Teresa; Saz-Parkinson, Zuleika; Amate-Blanco, José María (2014): Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011). In: *BMC infectious diseases* 14, S. 3863. DOI: 10.1186/s12879-014-0717-7.
- Bracht et al. 2019** Bracht, Hendrik; Hafner, Sebastian; Weiß, Manfred (2019): Sepsis-Update: Definition und Epidemiologie. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS* 54 (1), S. 10–20. DOI: 10.1055/a-0625-5492.
- Broze 2001** Broze, G. J. (2001): Protein Z-dependent regulation of coagulation. In: *Thromb. Haemost.* 86 (1), S. 8–13.
- Broze et al. 1984** Broze, G. J.; Miletich, J. P. (1984): Human Protein Z. In: *J. Clin. Invest.* 73 (4), S. 933–938.



- Broze et al. 2010** Broze, G. J.; Tu, Y. (2010): Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor and renal tubules. In: *Thromb Haemost* 103 (2), S. 473–474.
- Brunkhorst 2006** Brunkhorst, F. M. (2006): Epidemiologie, Ökonomie und Praxis -- Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). In: *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41 (1), S. 43–44.
- Brunkhorst et al. 2005** Brunkhorst, F. M.; Engel, C.; Reinhart, K.; Bone, H-G; Brunkhorst, R.; Burchardi, H. et al. (2005): Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany: results from the German 'Prevalence' study. In: *Crit Care* 9 (Suppl 1), P196.
- Butschkau et al. 2013** Butschkau, Antje; Nagel, Philipp; Grambow, Eberhard; Zechner, Dietmar; Broze, George J.; Vollmar, Brigitte (2013): Contribution of Protein Z and Protein Z-Dependent Protease Inhibitor in Generalized Shwartzman Reaction. In: *Critical care medicine*, S. 1.
- Caldwell et al. 2018** Caldwell, Alexa; Morick, Jan Niklas; Jentsch, Anne-Marie; Wegner, Annette; Pavlovic, Dragan; Al-Banna, Nadia; Lehmann, Christian (2018): Impact of insulin on the intestinal microcirculation in a model of sepsis-related hyperglycemia. In: *Microvascular research* 119, S. 117–128. DOI: 10.1016/j.mvr.2018.05.004.
- Cesari et al. 2007** Cesari, Francesca; Gori, Anna Maria; Fedi, Sandra; Abbate, Rosanna; Gensini, Gian Franco; Sofi, Francesco (2007): Modifications of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease. In: *Blood Coagul. Fibrinolysis* 18 (1), S. 85–86.
- Cleuren et al. 2010** Cleuren, A. C. A.; van der Linden, I. K.; Visser, Y. P. de; Wagenaar, G. T. M.; Reitsma, P. H.; van Vlijmen, B. J. M. (2010): 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol rapidly alters transcript levels of murine coagulation genes via estrogen receptor  $\alpha$ . In: *J. Thromb. Haemost.* 8 (8), S. 1838–1846.
- Cohen 2002** Cohen, Jonathan (2002): The immunopathogenesis of sepsis. In: *Nature* 420 (6917), S. 885–891.
- Corral et al. 2007** Corral, Javier; González-Conejero, Rocio; Hernández-Espinosa, David; Vicente, Vicente (2007): Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. In: *Br. J. Haematol.* 137 (2), S. 99–108.
- Corral et al. 2006** Corral, Javier; González-Conejero, Rocio; Soria, Jose Manuel; González-Porrás, Jose Ramón; Pérez-Ceballos, Elena; Lecumberri, Ramón et al. (2006): A non-sense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. In: *Blood* 108 (1), S. 177–183.
- Dejana et al. 2008** Dejana, Elisabetta; Orsenigo, Fabrizio; Lampugnani, Maria Grazia (2008): The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 13), S. 2115–2122. DOI: 10.1242/jcs.017897.

<b>Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.</b>	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.: Geschichte der Sepsis. <a href="http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Geschichte+der+Sepsis?sid=6ZHyuN8EQ0YutEBOSAahX0&amp;iid=2">http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Geschichte+der+Sepsis?sid=6ZHyuN8EQ0YutEBOSAahX0&amp;iid=2</a>
<b>Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.</b>	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.: Konsensuskonferenz - Kriterienkatalog für die Diagnose der Sepsis. <a href="http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Informationen+fuer+Mediziner/Kriterienkatalog+ESICM?sid=gdNBKI5Y8kXVTZYHm9WdJw&amp;iid=1">http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Informationen+fuer+Mediziner/Kriterienkatalog+ESICM?sid=gdNBKI5Y8kXVTZYHm9WdJw&amp;iid=1</a>
<b>Dewitte et al. 2017</b>	Dewitte, Antoine; Lepreux, Sébastien; Villeneuve, Julien; Rigother, Claire; Combe, Christian; Ouattara, Alexandre; Ripoche, Jean (2017): Blood platelets and sepsis pathophysiology: A new therapeutic prospect in critical ill patients? In: <i>Annals of Intensive Care</i> 7. DOI: 10.1186/s13613-017-0337-7.
<b>Donati et al. 2013</b>	Donati, Abele; Damiani, Elisa; Botticelli, Laura; Adrario, Erica; Lombrano, Maria Rita; Domizi, Roberta et al. (2013): The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. In: <i>BMC anesthesiology</i> 13 (1), S. 25. DOI: 10.1186/1471-2253-13-25.
<b>Duarte et al. 2016</b>	Duarte, Djane B.; Vasko, Michael R.; Fehrenbacher, Jill C. (2016): Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. In: <i>Current protocols in pharmacology</i> 72, 5.6.1-9. DOI: 10.1002/0471141755.ph0506s72.
<b>Edwards et al. 1981</b>	Edwards, J. C.; Sedgwick, A. D.; Willoughby, D. A. (1981): The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. In: <i>The Journal of pathology</i> 134 (2), S. 147–156. DOI: 10.1002/path.1711340205.
<b>Ellis et al. 2005</b>	Ellis, Christopher G.; Jagger, Justin; Sharpe, Michael (2005): The microcirculation as a functional system. In: <i>Crit Care</i> 9 Suppl 4, S3-8.
<b>Engel et al. 2007</b>	Engel, Christoph; Brunkhorst, Frank M.; Bone, Hans-Georg; Brunkhorst, Reinhard; Gerlach, Herwig; Grund, Stefan et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. In: <i>Intensive Care Med</i> 33 (4), S. 606–618.
<b>Ertmer et al. 2016</b>	Ertmer, Christian; Rehberg, Sebastian (2016): Pathophysiologie der Sepsis. In: <i>Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)</i> 141 (15), S. 1067–1073. DOI: 10.1055/s-0042-110742.
<b>Esmon 2005</b>	Esmon, Charles T. (2005): The interactions between inflammation and coagulation. In: <i>Br J Haematol</i> 131 (4), S. 417–430.

- Fischer et al. 1996** Fisher, C. J.; Agosti, J. M.; Opal, S. M.; Lowry, S. F.; Balk, R. A.; Sadoff, J. C. et al. (1996): Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. In: *The New England journal of medicine* 334 (26), S. 1697–1702. DOI: 10.1056/NEJM199606273342603.
- Fleischmann et al. 2016** Fleischmann, Carolin; Thomas-Rueddel, Daniel O.; Hartmann, Michael; Hartog, Christiane S.; Welte, Tobias; Heublein, Steffen et al. (2016): Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. In: *Deutsches Arzteblatt international* 113 (10), S. 159–166. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0159.
- Foley et al. 2016** Foley, Jonathan H.; Conway, Edward M. (2016): Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. In: *Circulation research* 118 (9), S. 1392–1408. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
- Foreman et al. 1994** Foreman, K. E.; Vaporciyan, A. A.; Bonish, B. K.; Jones, M. L.; Johnson, K. J.; Glovsky, M. M. et al. (1994): C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. In: *J. Clin. Invest.* 94 (3), S. 1147–1155.
- Foster et al. 1985** Foster, D. C.; Yoshitake, S.; Davie, E. W. (1985): The nucleotide sequence of the gene for human protein C. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (14), S. 4673–4677. DOI: 10.1073/pnas.82.14.4673.
- Franchi et al. 2006** Franchi, Luigi; McDonald, Christine; Kanneganti, Thirumala-Devi; Amer, Amal; Núñez, Gabriel (2006): Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. In: *J. Immunol.* 177 (6), S. 3507–3513.
- Frank et al. 1991** Frank, M. M.; Fries, L. F. (1991): The role of complement in inflammation and phagocytosis. In: *Immunol. Today* 12 (9), S. 322–326.
- Fujimaki et al. 1998** Fujimaki, K.; Yamazaki, T.; Taniwaki, M.; Ichinose, A. (1998): The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. In: *Biochemistry* 37 (19), S. 6838–6846.
- Girard et al. 2019** Girard, T. J.; Lasky, N. M.; Grunz, K.; Broze, G. J. (2019): Suppressing protein Z-dependent inhibition of factor Xa improves coagulation in hemophilia A. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17 (1), S. 149–156. DOI: 10.1111/jth.14337.
- Girard et al. 2013** Girard, T. J.; Lasky, N. M.; Tuley, E. A.; Broze, G. J. (2013): Protein Z, Protein Z-Dependent Protease Inhibitor (Serpina10) and the Acute Phase Response. In: *J. Thromb. Haemost.* 11 (2), S. 375–378.
- Gogos et al. 2000** Gogos, C. A.; Drosou, E.; Bassaris, H. P.; Skoutelis, A. (2000): Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. In: *The Journal of infectious diseases* 181 (1), S. 176–180. DOI: 10.1086/315214.

- Grütz 2005** Grütz, Gerald (2005): New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. In: *J. Leukoc. Biol.* 77 (1), S. 3–15. DOI: 10.1189/jlb.0904484.
- Gyawali et al. 2019** Gyawali, Bishal; Ramakrishna, Karan; Dhamoon, Amit S. (2019): Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. In: *SAGE open medicine* 7, 2050312119835043. DOI: 10.1177/2050312119835043.
- Hagel et al. 2011** Hagel, S.; Brunkhorst, F. (2011): Sepsis. In: *Intensivmed* 48 (1), S. 57–73.
- Hall et al. 2011** Hall, Margaret Jean; Williams, Sonja N.; DeFrances, Carol J.; Golosinskiy, Aleksandr (2011): Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. In: *NCHS data brief* (62), S. 1–8.
- Han et al. 1998** Han, X.; Fiehler, R.; Broze, G. J. (1998): Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (16), S. 9250–9255.
- Han et al. 2000** Han, X.; Fiehler, R.; Broze, G. J. (2000): Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. In: *Blood* 96 (9), S. 3049–3055.
- Han et al. 1999** Han, X.; Huang, Z. F.; Fiehler, R.; Broze, G. J. (1999): The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. In: *Biochemistry* 38 (34), S. 11073–11078.
- Harrison et al. 2006** Harrison, David A.; Welch, Catherine A.; Eddleston, Jane M. (2006): The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. In: *Crit Care* 10 (2), R42. DOI: 10.1186/cc4854.
- Heeb et al. 2005** Heeb, Mary J.; Cabral, Katia M.; Ruan, Lingjuan (2005): Down-regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor. In: *J. Biol. Chem.* 280 (40), S. 33819–33825.
- Heeb et al. 2007** Heeb, Mary J.; Fisher, Mark; Paganini-Hill, Annlia (2007): Association of low protein Z levels with ischemic stroke in young women. In: *Thromb. Haemost.* 97 (3), S. 495–496.
- Heeb et al. 2002** Heeb, Mary J.; Paganini-Hill, Annlia; Griffin, John H.; Fisher, Mark (2002): Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. In: *Blood Cells Mol. Dis.* 29 (2), S. 139–144.
- Hoffmann et al. 1999** Hoffmann, J. N.; Vollmar, B.; Inthorn, D.; Schildberg, F. W.; Menger, M. D. (1999): A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. In: *Shock* 12 (5), S. 355–364.

- Hosac 2002** Hosac, Anita Marie (2002): Drotrecogin alfa (activated): the first FDA-approved treatment for severe sepsis. In: *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* 15 (2), S. 224–227. PMID: 16333441.
- Hotchkiss et al. 2003** Hotchkiss, Richard S.; Karl, Irene E. (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. In: *N. Engl. J. Med.* 348 (2), S. 138–150.
- Huang et al. 2011** Huang, Xin; Rezaie, Alireza R.; Broze, George J.; Olson, Steven T. (2011): Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. In: *J. Biol. Chem.* 286 (11), S. 8740–8751.
- Huang et al. 2008** Huang, Xin; Swanson, Richard; Broze, George J.; Olson, Steven T. (2008): Kinetic characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor reaction with blood coagulation factor Xa. In: *J. Biol. Chem.* 283 (44), S. 29770–29783.
- Huang et al. 2019** Huang, Xin; Swanson, Richard; Kroh, Heather K.; Bock, Paul E. (2019): Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) is a physiologically significant inhibitor of prothrombinase function. In: *J. Biol. Chem.*
- Ichinose et al. 1990** Ichinose, A.; Takeya, H.; Espling, E.; Iwanaga, S.; Kisiel, W.; Davie, E. W. (1990): Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (3), S. 1139–1144.
- Kapur et al. 2015** Kapur, Rick; Zufferey, Anne; Boilard, Eric; Semple, John W. (2015): Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. In: *J. Immunol.* 194 (12), S. 5579–5587. DOI: 10.4049/jimmunol.1500259.
- Kemkes-Matthes et al. 1995** Kemkes-Matthes, B.; Matthes, K. J. (1995): Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. In: *Haemostasis* 25 (6), S. 312–316.
- Kobelt et al. 2001** Kobelt, K.; Biasiutti, F. D.; Mattle, H. P.; Lämmle, B.; Wuillemin, W. A. (2001): Protein Z in ischaemic stroke. In: *Br. J. Haematol.* 114 (1), S. 169–173.
- Kumar et al. 2006** Kumar, Anand; Roberts, Daniel; Wood, Kenneth E.; Light, Bruce; Parrillo, Joseph E.; Sharma, Satendra et al. (2006): Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock\*. In: *Critical Care Medicine* 34 (6), S. 1589–1596. DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.
- Kumar 2019** Kumar, Vijay (2019): Immunometabolism: Another Road to Sepsis and Its Therapeutic Targeting. In: *Inflammation* 42 (3), S. 765–788. DOI: 10.1007/s10753-018-0939-8.
- Laschke et al. 2011** Laschke, M. W.; Vollmar, B.; Menger, M. D. (2011): The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. In: *Eur Cell Mater* 22, 147-64; discussion 164-7.

- Lehr et al. 1993** Lehr, H. A.; Leunig, M.; Menger, M. D.; Nolte, D.; Messmer, K. (1993): Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. In: *The American Journal of Pathology* 143 (4), S. 1055–1062.
- Levi 2007** Levi, Marcel (2007): Disseminated intravascular coagulation. In: *Critical Care Medicine* 35 (9), S. 2191–2195. DOI: 10.1097/01.CCM.0000281468.94108.4B.
- Levi et al. 2004** Levi, Marcel; Jonge, Evert de; van der Poll, Tom (2004): New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology. In: *Annals of Medicine* 36 (1), S. 41–49.
- Levi et al. 2017** Levi, Marcel; van der Poll, Tom (2017): Coagulation and sepsis. In: *Thromb. Res.* 149, S. 38–44. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.11.007.
- Levy et al. 2018** Levy, Mitchell M.; Evans, Laura E.; Rhodes, Andrew (2018): The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. In: *Intensive Care Med* 44 (6), S. 925–928. DOI: 10.1007/s00134-018-5085-0.
- Levy et al. 2014** Levy, Mitchell M.; Rhodes, Andrew; Phillips, Gary S.; Townsend, Sean R.; Schorr, Christa A.; Beale, Richard et al. (2014): Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. In: *Intensive care medicine* 40 (11), S. 1623–1633. DOI: 10.1007/s00134-014-3496-0.
- Li X et al. 2017** Li, Xi; Xu, Zhiheng; Pang, Xiaoqing; Huang, Yongbo; Yang, Baoxin; Yang, Yuanyuan et al. (2017): Interleukin-10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients. In: *PloS one* 12 (6), e0179050.
- Lichy et al. 2004** Lichy, C.; Kropp, S.; Dong-Si, T.; Genius, J.; Dolan, T.; Hampe, T. et al. (2004): A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. In: *Stroke* 35 (1), S. 40–45. DOI: 10.1161/01.STR.0000106909.75418.E4.
- Lim et al. 1998** Lim, Y. C.; Snapp, K.; Kansas, G. S.; Camphausen, R.; Ding, H.; Luscinskas, F. W. (1998): Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro. In: *J. Immunol.* 161 (5), S. 2501–2508.
- Lipinski et al. 2011** Lipinski, S.; Bremer, L.; Lammers, T.; Thieme, F.; Schreiber, S.; Rosenstiel, P. (2011): Coagulation and inflammation. Molecular insights and diagnostic implications. In: *Hamostaseologie* 31 (2), 94-102, 104.
- Martin et al. 2003** Martin, Greg S.; Mannino, David M.; Eaton, Stephanie; Moss, Marc (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. In: *N. Engl. J. Med.* 348 (16), S. 1546–1554. DOI: 10.1056/NEJMoa022139.

- Martin et al. 2019** Martin, Lukas; Bickenbach, Johannes; Marx, Gernot (2019): Sepsis-Update: evidenzbasierte Therapie. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS* 54 (1), S. 50–62. DOI: 10.1055/a-0625-5521.
- Marx et al. 2018** Marx, Gernot (2018): Correction to: Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. In: *Intensive care medicine* 44 (1), S. 153–156. DOI: 10.1007/s00134-017-4980-0.
- Mathiak et al. 2000** Mathiak, G.; Szewczyk, D.; Abdullah, F.; Ovadia, P.; Feuerstein, G.; Rabinovici, R. (2000): An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. In: *Critical Care Medicine* 28 (6), S. 1947–1952.
- Menger et al. 1999** Menger, M. D.; Richter, S.; Yamauchi, J. I.; Vollmar, B. (1999): Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. In: *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 28 (4), S. 542–556.
- Menger et al. 2002** Menger, Michael D.; Laschke, Matthias W.; Vollmar, Brigitte (2002): Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 34 (1-2), S. 83–91.
- Moerer et al. 2006** Moerer, O.; Burchardi, H. (2006): Kosten der Sepsis. In: *Anaesthesist* 55 (S1), S. 36–42. DOI: 10.1007/s00101-006-1039-y.
- Nemeth et al. 2014** Nemeth, Elizabeta; Ganz, Tomas (2014): Anemia of inflammation. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 28 (4), 671-81, vi.
- Ng et al. 2013** Ng, T. H. Sky; Britton, Graham J.; Hill, Elaine v.; Verhagen, Johan; Burton, Bronwen R.; Wraith, David C. (2013): Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. In: *Frontiers in Immunology* 4.
- Oberholzer et al. 2001** Oberholzer, A.; Oberholzer, C.; Moldawer, L. L. (2001): Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. In: *Shock* 16 (2), S. 83–96.
- Oberholzer et al. 2002** Oberholzer, Andreas; Oberholzer, Caroline; Moldawer, Lyle L. (2002): Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. In: *Critical Care Medicine* 30 (1 Suppl), S58-63.
- Ohashi et al. 2012** Ohashi, Junko; Sawada, Ayuko; Nakajima, Sota; Noda, Kazuki; Takaki, Aya; Shimokawa, Hiroaki (2012): Mechanisms for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice. In: *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 76 (7), S. 1768–1779.

- Park et al. 2004** Park, Jong Sung; Svetkauskaite, Daiva; He, Qianbin; Kim, Jae-Yeol; Strassheim, Derek; Ishizaka, Akitoshi; Abraham, Edward (2004): Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. In: *J. Biol. Chem.* 279 (9), S. 7370–7377. DOI: 10.1074/jbc.M306793200.
- Petri et al. 2006** Petri, Björn; Bixel, M. Gabriele (2006): Molecular events during leukocyte diapedesis. In: *FEBS J.* 273 (19), S. 4399–4407. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05439.x.
- Prowse et al. 1977** Prowse, C. V.; Esnouf, M. P. (1977): The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. In: *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1), S. 255–256.
- Raczkowski et al. 1987** Raczkowski CA; Reichlin M.; Esmon CT; Comp PC (1987): Protein Z is a negatively responding acute phase protein. Abstract #1427. In: *Blood* (70), 393a.
- Ranieri et al. 2012** Ranieri, V. Marco; Thompson, B. Taylor; Barie, Philip S.; Dhainaut, Jean-François; Douglas, Ivor S.; Finfer, Simon et al. (2012): Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. In: *N. Engl. J. Med.* 366 (22), S. 2055–2064. DOI: 10.1056/NEJMoa1202290.
- Rassow et al. 2006** Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2006): Biochemie. Duale Reihe. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Razzari et al. 2006** Razzari, Cristina; Martinelli, Ida; Bucciarelli, Paolo; Viscardi, Ylenia; Biguzzi, Eugenia (2006): Polymorphisms of the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) gene and the risk of venous thromboembolism. In: *Thromb. Haemost.* 95 (5), S. 909–910.
- Refaai et al. 2006** Refaai, M. A.; Ahn, C.; Lu, L.; Wu, K.; Broze, G. J. (2006): Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. In: *J. Thromb. Haemost.* 4 (7), S. 1628–1629. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02012.x.
- Reggiori et al. 2009** Reggiori, Giulia; Occhipinti, Giovanna; Gasperi, Andrea de; Vincent, Jean-Louis; Piagnerelli, Michael (2009): Early alterations of red blood cell rheology in critically ill patients. In: *Critical Care Medicine* 37 (12), S. 3041–3046.
- Reinhart et al. 2010** Reinhart, K.; Brunkhorst, F. M.; Bone, H-G; Bardutzky, J.; Dempfle, C-E; Forst, H. et al. (2010): Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). In: *Ger Med Sci* 8, Doc14. DOI: 10.3205/000103.
- Rello et al. 2017** Rello, Jordi; Valenzuela-Sánchez, Francisco; Ruiz-Rodriguez, Maria; Moyano, Silvia (2017): Sepsis: A Review of Advances in Management. In: *Advances in therapy* 34 (11), S. 2393–2411. DOI: 10.1007/s12325-017-0622-8.



- Remick et al. 2000** Remick, D. G.; Newcomb, D. E.; Bolgos, G. L.; Call, D. R. (2000): Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 13 (2), S. 110–116.
- Remick 2007** Remick, Daniel G. (2007): Pathophysiology of Sepsis. In: *The American Journal of Pathology* 170 (5), S. 1435–1444. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060872.
- Rezaie et al. 2008** Rezaie, Alireza R.; Bae, Jong-Sup; Manithody, Chandrashekhara; Qureshi, Shabir H.; Yang, Likui (2008): Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z. In: *J. Biol. Chem.* 283 (29), S. 19922–19926. DOI: 10.1074/jbc.M802639200.
- Rhodes et al. 2017** Rhodes, Andrew; Evans, Laura E.; Alhazzani, Waleed; Levy, Mitchell M.; Antonelli, Massimo; Ferrer, Ricard et al. (2017): Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. In: *Crit. Care Med.* 45 (3), S. 486–552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255.
- Ribeiro et al. 1997** Ribeiro, R. A.; Souza-Filho, M. V.; Souza, M. H.; Oliveira, S. H.; Costa, C. H.; Cunha, F. Q.; Ferreira, H. S. (1997): Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112 (1), S. 27–35.
- Rittirsch et al. 2007** Rittirsch, Daniel; Hoesel, L. Marco; Ward, Peter A. (2007): The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. In: *J. Leukoc. Biol.* 81 (1), S. 137–143.
- Robinson et al. 2006** Robinson, Matthew J.; Sancho, David; Slack, Emma C.; LeibundGut-Landmann, Salomé; Sousa, Caetano Reis e. (2006): Myeloid C-type lectins in innate immunity. In: *Nat Immunol* 7 (12), S. 1258–1265. DOI: 10.1038/ni1417.
- Rosadini et al. 2017** Rosadini, Charles V.; Kagan, Jonathan C. (2017): Early innate immune responses to bacterial LPS. In: *Current opinion in immunology* 44, S. 14–19. DOI: 10.1016/j.coi.2016.10.005.
- Santacroce et al. 2006** Santacroce, R.; Sarno, M.; Cappucci, F.; Sessa, F.; Colaizzo, D.; Brancaccio, V. et al. (2006): Low protein Z levels and risk of occurrence of deep vein thrombosis. In: *J. Thromb. Haemost.* 4 (11), S. 2417–2422. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02186.x.
- Schmid et al. 2002** Schmid, A.; Burchardi, H.; Clouth, J.; Schneider, H. (2002): Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. In: *Eur J Health Econ* 3 (2), S. 77–82. DOI: 10.1007/s10198-002-0095-8.
- Schramm et al. 2000** Schramm, R.; Liu, Q.; Thorlacius, H. (2000): Expression and function of MIP-2 are reduced by dexamethasone treatment in vivo. In: *Br. J. Pharmacol.* 131 (2), S. 328–334. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703543.

- Schreiter et al. 2017** Schreiter, Jeannine; Meyer, Sophia; Schmidt, Christian; Schulz, Ronny M.; Langer, Stefan (2017): Dorsal skinfold chamber models in mice. In: *GMS Interdisciplinary plastic and reconstructive surgery DGPW* 6, Doc10.
- Schütt et al. 2009** Schütt, Christine; Bröker, Barbara (2009): Grundwissen Immunologie. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 978-3-8274-2027-5
- Secklehner et al. 2017** Secklehner, Judith; Lo Celso, Cristina; Carlin, Leo M. (2017): Intravital microscopy in historic and contemporary immunology. In: *Immunology and cell biology* 95 (6), S. 506–513.
- Shang et al. 2005** Shang, Yi; Pan, Xue-Yi; Ding, Cai-Ping; Yang, Xin-Mei; Cai, Xiao-Yan; Ding, Ying; Zhang, Rou-Ling (2005): [Clinical significance of protein Z detection in patients with malignant tumors]. In: *Ai Zheng* 24 (9), S. 1144–1147.
- Sharawy et al. 2014** Sharawy, Nivin (2014): Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? In: *Journal of critical care* 29 (1), S. 83–87.
- Shimazu et al. 1999** Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K.; Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. In: *J. Exp. Med.* 189 (11), S. 1777–1782.
- Singer et al. 2016** Singer, Mervyn; Deutschman, Clifford S.; Seymour, Christopher Warren; Shankar-Hari, Manu; Annane, Djillali; Bauer, Michael et al. (2016): The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In: *JAMA* 315 (8), S. 801. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- Solfstra et al. 2006** Solfstra, Sjoukje H.; Cate, Hugo ten; Spek, C. Arnold (2006): Low dose endotoxin priming is accountable for coagulation abnormalities and organ damage observed in the Shwartzman reaction. A comparison between a single-dose endotoxemia model and a double-hit endotoxin-induced Shwartzman reaction. In: *Thrombosis journal* 4, S. 13.
- Smart et al. 1994** Smart, S. J.; Casale, T. B. (1994): TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. In: *The American journal of physiology* 266 (3 Pt 1), L238-45.
- Sofi et al. 2009** Sofi, F.; Cesari, F.; Tu, Y.; Pratesi, G.; Pulli, R.; Pratesi, C. et al. (2009): Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. In: *J. Thromb. Haemost.* 7 (5), S. 731–735. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03325.x.
- Sofi et al. 2010** Sofi, Francesco; Cesari, Francesca; Abbate, Rosanna; Gensini, Gian Franco; Broze, George; Fedi, Sandra (2010): A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. In: *Thromb. Haemost.* 103 (4), S. 749–756. DOI: 10.1160/TH09-09-0645.

- Souri et al. 2009** Souri, Masayoshi; Iwata, Hiroki; Zhang, Wei Guang; Ichinose, Akitada (2009): Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. In: *Blood* 113 (16), S. 3857–3864. DOI: 10.1182/blood-2008-07-171884.
- Spronk et al. 2004** Spronk, Peter E.; Zandstra, Durk F.; Ince, Can (2004): Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation. In: *Crit Care* 8 (6), S. 462. DOI: 10.1186/cc2894.
- Stevens et al. 2017** Stevens, Natalie E.; Chapman, Marianne J.; Fraser, Cara K.; Kuchel, Tim R.; Hayball, John D.; Diener, Kerrilyn R. (2017): Therapeutic targeting of HMGB1 during experimental sepsis modulates the inflammatory cytokine profile to one associated with improved clinical outcomes. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 5850. DOI: 10.1038/s41598-017-06205-z.
- Stortz et al. 2017** Stortz, Julie A.; Raymond, Steven L.; Mira, Juan C.; Moldawer, Lyle L.; Mohr, Alicia M.; Efron, Philip A. (2017): Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? In: *ILAR journal* 58 (1), S. 90–105.
- Tabatabai et al. 2001** Tabatabai, A.; Fiehler, R.; Broze, G. J. (2001): Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. In: *Thromb. Haemost.* 85 (4), S. 655–660.
- Tang et al. 2018** Tang, B. M.; Herwanto, V.; McLean, A. S. (2018): Immune Paralysis in Sepsis: Recent Insights and Future Development. In: Jean-Louis Vincent (Hg.): *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2018*, Bd. 369. Cham: Springer International Publishing (Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine), S. 13–23. DOI: 10.1007/978-3-319-73670-9\_2.
- Torio et al. 2013** Torio, Celeste M.; Andrews, Roxanne M. (2013): National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006 Feb-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169005/>.
- Trappe et al. 2005** Trappe, U.; Riess, H. (2005): Pathophysiologische Grundsätze bei Sepsis. In: *Hamostaseologie* 25 (2), S. 175–182. DOI: 10.1267/Hämo05020175.
- Uhle et al. 2015** Uhle, Florian; Lichtenstern, Christoph; Brenner, Thorsten; Weigand, Markus A. (2015): Sepsis und Multiorganversagen - Pathophysiologie der Sepsis. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 50 (2), S. 114–122. DOI: 10.1055/s-0041-100391.
- Undar et al. 1999** Undar, L.; Karadoğan, I.; Oztürk, F. (1999): Plasma protein Z levels inversely correlate with plasma interleukin-6 levels in patients with acute leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. In: *Thromb. Res.* 94 (2), S. 131–134.

- Vajkoczy et al. 2000** Vajkoczy, P.; Ullrich, A.; Menger, M. D. (2000): Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2 (1-2), S. 53–61.
- van der Heijden et al. 2009** van der Heijden, Melanie; Pickkers, Peter; van Nieuw Amerongen, Geerten P.; van Hinsbergh, Victor W. M.; Bouw, Martijn P. W. J. M.; van der Hoeven, Johannes G.; Groeneveld, A. B. Johan (2009): Circulating angiopoietin-2 levels in the course of septic shock: relation with fluid balance, pulmonary dysfunction and mortality. In: *Intensive care medicine* 35 (9), S. 1567–1574.
- Vasse 2011** Vasse, M. (2011): The protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor complex. In: *Hämostaseologie* 31 (3), S. 155–164. DOI: 10.5482/ha-1161.
- Vasse et al. 2001** Vasse, M.; Guegan-Massardier, E.; Borg, J. Y.; Woimant, F.; Soria, C. (2001): Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. In: *Lancet* 357 (9260), S. 933–934. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04218-5.
- Vasse 2008** Vasse, Marc (2008): Protein Z, a protein seeking a pathology. In: *Thromb Haemost.* DOI: 10.1160/TH08-01-0024.
- Vasse et al. 2006** Vasse, Marc; Denoyelle, Christophe; Corbière, Cécile; Litzler, Pierre-Yves; Legrand, Elisabeth; Vannier, Jean-Pierre (2006): Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependent inhibitor. In: *Thromb. Haemost.* 95 (3), S. 519–523. DOI: 10.1267/THRO06030519.
- Vasse et al. 2002** Vasse, Marc; Denoyelle, Christophe; Legrand, Elisabeth; Vannier, Jean-Pierre; Soria, Claudine (2002): Weak regulation of protein Z biosynthesis by inflammatory cytokines. In: *Thromb. Haemost.* 87 (2), S. 350–351.
- Vincent et al. 1996** Vincent, J. L.; Moreno, R.; Takala, J.; Willatts, S.; Mendonça, A. de; Bruining, H. et al. (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. In: *Intensive Care Med* 22 (7), S. 707–710.
- Vincent et al. 2009** Vincent, Jean-Louis; Rello, Jordi; Marshall, John; Silva, Eliezer; Anzueto, Antonio; Martin, Claude D. et al. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. In: *JAMA* 302 (21), S. 2323–2329. DOI: 10.1001/jama.2009.1754.
- Vincent et al. 2014** Vincent, Jean-Louis; Marshall, John C.; Namendys-Silva, Silvio A.; François, Bruno; Martin-Loeches, Ignacio; Lipman, Jeffrey et al. (2014): Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 2 (5), S. 380–386. DOI: 10.1016/S2213-2600(14)70061-X.
- Vollmar 2011** Vollmar, B. (2011): Pathophysiologische Grundlagen der chirurgisch-bedingten Sepsis. In: *Chirurg* 82 (3), S. 199–207. DOI: 10.1007/s00104-010-2010-7.

- Wang et al. 2004** Wang, H.; Yang, H.; Tracey, K. J. (2004): Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. In: *J. Intern. Med.* 255 (3), S. 320–331.
- Weis et al. 2017** Weis, Sebastian; Dickmann, Petra; Pletz, Mathias W.; Coldewey, Sina M.; Gerlach, Herwig; Bauer, Michael: Sepsis 2017: Eine neue Definition führt zu neuen Konzepten. In: *Dtsch Arztebl* 2017, 114(29-30): A-1424 / B-1196 / C-1170. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/192597/Sepsis-2017-Eine-neue-Definition-fuehrt-zu-neuen-Konzepten>.
- Wendel et al. 2009** Wendel, M.; Heller, A.R; Koch, T. (2009): Pathomechanismen des Organversagens. In: *Anaesthesist* 58 (4), S. 343–352. DOI: 10.1007/s00101-009-1537-9.
- Werdan et al. 2016** Werdan, Karl; Müller-Werdan, Ursula; Schuster, Hans-Peter; Brunkhorst, Frank (Hg.) (2016): Sepsis und MODS. 5., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer Medizin. ISBN: 978-3-662-45147-2.
- Wright et al. 1990** Wright, S.; Ramos, R.; Tobias, P.; Ulevitch, R.; Mathison, J. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. In: *Science* 249 (4975), S. 1431–1433. DOI: 10.1126/science.1698311.
- Yin et al. 2000** Yin, Z. F.; Huang, Z. F.; Cui, J.; Fiehler, R.; Lasky, N.; Ginsburg, D.; Broze, G. J. (2000): Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (12), S. 6734–6738. DOI: 10.1073/pnas.120081897.
- Zhang et al. 2008** Zhang, Jing; Tu, Yizheng; Lu, Lan; Lasky, Nina; Broze, George J. (2008): Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. In: *Blood* 111 (10), S. 4973–4978. DOI: 10.1182/blood-2007-12-126391.
- Zhou et al. 2012** Zhou, Gang; Kamenos, George; Pendem, Suresh; Wilson, John X.; Wu, Feng (2012): Ascorbate protects against vascular leakage in cecal ligation and puncture-induced septic peritonitis. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 302 (4), R409-16. DOI: 10.1152/ajpregu.00153.2011.

## 6. Glossar

aPC	aktiviertes Protein C
BE	Blutentnahme
C5aR	C5a Rezeptor
CAE	Chloracetatesterase
CARS	<i>compensatory antiinflammatory response syndrome</i>
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
CR3	<i>complement receptor 3</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
EDHF	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPCR	<i>endothelial protein C receptor</i>
FCD	funktionelle kapilläre Dichte
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
LFA-1	<i>leucocyte function associated molecule-1</i>
GF	Gesichtsfeld
GSR	generalisierte Schwartzman Reaktion
H	Stunde(n)
HMGB1	<i>high-mobility-group-protein B1</i>
i.v.	intravenös

ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare-NO-Synthase
IVM	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LA	leukozytäre Adhärenz
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAD	mittlerer arterieller Druck
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MD-2	<i>Lymphocyte antigen 96</i>
Min	Minute(n)
MOV	Multiorganversagen
N	Anzahl
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	<i>nuclear factor- <math>\kappa</math>B</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
paCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAF	Plättchen-Aktivierender-Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
paO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAR	<i>protease-activated receptors</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCT	Procalcitonin

PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PZ	Protein Z
PZko	Protein Z <i>knock-out</i>
qSOFA	<i>quick Sepsis-related Organ Failure Assessment Score</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
rhAPC	rekombinantes aktiviertes Protein C
RLR	<i>retinoid acid-inducible gene 1-like receptor</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	Subkutan
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
sNP	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
SOFA	<i>Sepsis-related Organ Failure Assessment Score</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Th	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	Thrombomodulin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VBF	volumetrischer Blutfluss
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WSR	Wandscherrate
WT	Wildtyp
ZPI	Protein Z abhängiger Protease Inhibitor
ZPIko	Protein Z abhängiger Protease Inhibitor <i>knock-out</i>
ZVD	zentraler Venendruck





## 7. CURRICULUM VITAE

### **Persönliche Daten:**

Name: Philipp Nagel

Geburtsdatum: 24.04.1988

Geburtsort: Riesa

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### **Beruflicher Werdegang:**

Seit 2013 Assistenzarzt, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck

### **Wissenschaftliche Tätigkeiten:**

26.10.2019 Vortrag, Thema: *“Kite surfing and Neurosurgery – an unholy alliance?”*, Norddeutscher Neurochirurgentag, Neumünster

28.03.2019 Posterpräsentation, Thema: *“Multiple minimal invasive neurostimulation procedures in the consecutive treatment course of a patient with chronic neuropathic pain after ulnar nerve decompression.”*, 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München

2012 – 2013 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

2013 Gleichberechtigte Erst-Autorenschaft, *“Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Schwartzman reaction.”*, Butschkau et al. 2013, *Critical Care Medicine*, PMID: 23963134

**Ausbildung:**

1994 – 1998    Grundschule „Am Drachenberg“, Meiningen

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken für die langjährige, geduldige und moralische Unterstützung sowie Motivation bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Institut durchzuführen sowie für Ihre fachliche Betreuung, Beratung und freundliche Unterstützung in jeder Phase der Erstellung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich nach Beendigung meines Studiums als studentische Hilfskraft weiterhin wissenschaftlich am Institut tätig sein durfte. Ebenso bedanke ich mich für die Möglichkeit der Veröffentlichung meiner Ergebnisse.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Antje Butschkau für die konstruktive Zusammenarbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner für die fachliche Beteiligung und moralische Unterstützung an diesem Projekt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff und Maren Nerowski für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz im Laboralltag.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau Anja Gellert für ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus danke ich Reinhard Schwärmer, Kathrin Sievert, Karin Gerber für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, bin ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar.

## Thesen zur Dissertation

1. Die Sepsis stellt bis heute ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit hoher Letalität dar.
2. Die Grundlagen der septischen Pathophysiologie liegen in einer inadäquaten Reaktion des Organismus auf eine Infektion mit einhergehender Aktivierung der Inflammations- sowie Koagulations-Kaskade, Störung der Mikrozirkulation und konsekutiver Organdysfunktion.
3. In der Grundlagenforschung der Sepsis hinsichtlich der Pathophysiologie sowie der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten spielt das Maus-Modell bis heute eine wichtige präklinische Rolle.
4. Die generalisierte Schwartzman Reaktion (GSR) stellt ein einfaches, reproduzierbares und etabliertes Sepsis-Modell der Maus dar.
5. Die Intravitalmikroskopie der dorsalen Rückenhautkammer ist eine ideale Technologie, um repetitive Untersuchungen an einem Sepsis-Modell zu ermöglichen.
6. Die Interleukin-10 Plasmakonzentration während einer Sepsis stellt einen guten Indikator für die Schwere des Verlaufes dar.
7. Eine GSR geht einher mit einer ausgeprägten Aktivierung der Inflammation, Koagulation sowie konsekutiven Verschlechterung der Mikrohämodynamik und beinhaltet somit wichtige, pathophysiologische Elemente eines septischen Krankheitsbildes.
8. Eine Protein Z (PZ)-Defizienz bewirkt nach Induktion der GSR eine aggravierte Immunreaktion, gekennzeichnet durch eine akzelerierte, transendotheliale Leukozyten-Migration, konsekutiv frühzeitiger Leukozytopenie sowie durch ein akzentuiertes pro- und antiinflammatorisches Zytokinprofil.
9. Eine Protein Z abhängige Protease Inhibitor (ZPI)-Defizienz bewirkt nach Induktion der GSR eine aggravierte, septische Koagulopathie mit akzelerierter Ausbildung einer disseminierten intravasalen Koagulopathie.
10. Im Umkehrschluss hat PZ eine anti-inflammatorische und ZPI eine anti-koagulatorische Potenz während einer GSR.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Promotionsarbeit selbständig und nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Passagen verwendeter Literaturquellen sind als solche kenntlich gemacht.

Darüber hinaus versichere ich, dass diese Arbeit nicht zuvor und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 17.07.2019

Philipp Nagel